

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal)



TESIS DOCTORAL

Efecto de la fuente y nivel de zinc en el comportamiento productivo de machos no castrados (40-110 kg) y su relación con el comportamiento sexual

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Yasmín Gpe de Loera Ortega

Directores

**Carlos García Artiga
Beatriz Isabel Redondo
Antonio Palomo Yagüe**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA (FISIOLÓGÍA ANIMAL)
UNIDAD DOCENTE DE ZOOLOGÍA



Tesis Doctoral

**“EFECTO DE LA FUENTE Y NIVEL DE ZINC EN EL
COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE MACHOS NO
CASTRADOS (40-100 KG) Y SU RELACIÓN CON EL
COMPORTAMIENTO SEXUAL”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Yasmin Gpe De Loera Ortega

Bajo la dirección de los Doctores:

**Carlos García Artiga, Beatriz Isabel Redondo y
Antonio Palomo Yagüe**

Madrid, 2015

CARLOS GARCÍA ARTIGA, Profesor Titular del Departamento de Fisiología (Fisiología Animal) de la Unidad Docente de Zoología de la Facultad de Veterinaria de Madrid, UCM; **BEATRIZ ISABEL REDONDO**, Contratado Doctor del Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de Madrid, UCM y **ANTONIO PALOMO YAGÜE**, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía y Medicina Animal de la Facultad de Veterinaria de Madrid, UCM.

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Efecto de la fuente y nivel de Zinc en el comportamiento productivo de machos no castrados (40-110 kg) y su relación con el comportamiento sexual” de la que es autora **Dña. Yasmin Gpe De Loera Ortega**, ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple las condiciones legales exigidas para optar al grado de Doctora en Veterinaria.

Madrid, 28 de octubre de 2015

CARLOS GARCÍA ARTIGA

BEATRIZ ISABEL REDONDO

ANTONIO PALOMO YAGÜE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVO GENERAL	6
1.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. LOS MINERALES EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL	9
2.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL ZN	13
2.3. ACTUACIÓN DEL ZN EN EL ORGANISMO	14
2.3.1. ABSORCIÓN Y METABOLISMO	14
2.3.2. ALMACENAMIENTO Y EXCRECIÓN DE ZN	17
2.4. FUNCIONES DEL ZN	18
2.4.1. REGULADOR DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	18
2.4.2. REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS	20
2.4.3. REGULACIÓN ENZIMÁTICA	21
2.4.4. FACTOR ANTIOXIDANTE	23
2.4.5. SISTEMA GASTROINTESTINAL	24
2.4.6. SISTEMA INMUNOLÓGICO	24
2.4.7. FUNCIÓN EN EL CRECIMIENTO	25
2.4.8. FUNCIÓN EN LA REPRODUCCIÓN	25
2.4.8.1. PRODUCCIÓN HORMONAL	25
2.4.8.2. EL ZN EN LOS TESTÍCULOS	26
2.4.8.3. EFECTO DEL ZN EN EPIDÍDIMO Y ESPERMATOZOIDES	27
2.4.8.4. EFECTO DEL ZN EN GLÁNDULA PROSTÁTICA Y PLASMA SEMINAL	28
2.5. DEFICIENCIAS DE ZN	28
2.6. TOXICIDAD DE ZN	30
2.7. EL ZN EN LA ALIMENTACIÓN DE LOS CERDOS	32
2.7.1. NECESIDADES NUTRICIONALES DE ZN	37
2.8. MECANISMOS QUE CONTROLAN EL PROCESO REPRODUCTIVO DEL VERRACO	41
2.8.1. ESTRUCTURAS NEUROENDOCRINAS	41
2.8.2. REGULACIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADAS	42
2.9. TESTÍCULOS	45
2.9.1. PROLIFERACIÓN CELULAR	47
2.9.2. CÉLULAS DE SERTOLI	47
2.9.3. CÉLULAS DE LEYDIG	49
2.9.3.1. FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DE LEYDIG	53
2.9.4. CÉLULAS GERMINALES	55
2.10. EPIDÍDIMO	56
2.11. PUBERTAD EN EL MACHO	57
2.11.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA APARICIÓN DE LA PUBERTAD	59
2.12. MADUREZ SEXUAL EN EL VERRACO	61

2.12.1. VALORACIÓN MORFOMETRÍCA DE LOS MACHOS- ÍNDICES CORPORALES	62
2.13. COMPORTAMIENTO SEXUAL	65
2.14. LÍBIDO	67
2.14.1. FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA LÍBIDO	67
2.15. SELECCIÓN Y MANEJO DEL VERRACO	74
2.16. ALOJAMIENTO Y ÁREA DE ENTRENAMIENTO	75
2.17. INTERACCIÓN VERRACO - OPERARIO	78
2.18. ENTRENAMIENTO PARA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (IA)	84
3. MATERIAL Y MÉTODOS	91
3.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	91
3.1.1. MATERIAL DE LABORATORIO	92
3.1.1.1. EQUIPOS	92
3.1.1.1.1. PRODUCTOS QUÍMICOS Y SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA INVESTIGACIÓN	94
3.2. FASE EXPERIMENTAL DE LA INVESTIGACIÓN “A”. COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE LOS ANIMALES: PERIODO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> .	95
3.2.1.1. TRATAMIENTOS SUMINISTRADOS A LOS CERDOS PREPÚBERES	96
3.2.2. ASIGNACIÓN DE TRATAMIENTOS A LOS CERDOS PREPÚBERES	96
3.3. FASE EXPERIMENTAL DE LA INVESTIGACIÓN “B”. EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN MINERAL DE LOS TEJIDOS; MORFOMETRÍA TESTICULAR Y; CONCENTRACIÓN HORMONAL EN CERDOS PREPÚBERES.	98
3.3.1. EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN MINERAL	99
3.3.2. DIGESTIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS PARA EAA.	100
3.3.2.a. TEJIDOS PROCESADOS PARA DETERMINACIÓN MINERAL	100
3.3.2.b. PLASMA SANGUÍNEO PARA DETERMINACIÓN MINERAL	101
3.3.2.c. LECTURA DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (EAA)	102
3.3.3. PERFILES HORMONALES DE CERDOS PREPÚBERES	104
3.3.4. MORFOMETRÍA DEL TEJIDO TESTICULAR DE CERDOS PREPÚBERES	106
3.3.4.a. HISTOLOGÍA TESTICULAR	106
3.3.4.b. EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS HISTOLÓGICAS	108
3.4. FASE EXPERIMENTAL DE INVESTIGACIÓN “C”. EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO SEXUAL Y ESTABLECIMIENTO DEL ENTRENAMIENTO DE LOS VERRACOS JÓVENES.	110
3.4.1. VERRACOS E INSTALACIONES	110
3.4.2. TRATAMIENTOS SUMINISTRADOS A LOS VERRACOS JÓVENES	110
3.4.3. EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO SEXUAL DE LOS VERRACOS	111
3.4.4. PERFILES HORMONALES DE LOS VERRACOS JÓVENES	112
3.4.5. EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN MINERAL DE LOS TEJIDOS REPRODUCTIVOS DE VERRACOS JÓVENES	113
3.4.6. EVALUACIÓN DE LA MORFOMETRÍA TESTICULAR	113

4.	RESULTADOS	117
4.1.	CONSUMO DE PIENSO EN CERDOS PREPÚBERES	117
4.2.	CONSUMO DE PIENSO EN VERRACOS JÓVENES	119
4.3.	GANANCIAS DE PESO EN CERDOS PREPÚBERES	121
4.4.	GANANCIAS DE PESO EN VERRACOS JÓVENES	122
4.5.	CONVERSIÓN ALIMENTICIA EN CERDOS PREPÚBERES	124
4.6.	ÍNDICE GONADOSOMÁTICO DE VERRACOS JÓVENES.	125
4.7.	ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS LEYDI, CÉLULA DE SERTOLI, PESO TESTICULAR, PESO VIVO Y CONCENTRACIÓN DE TESTOSTERONA EN CERDOS PREPÚBERES Y VERRACOS JOVENES	127
4.8.	CONCENTRACIÓN DE MINERALES EN TEJIDOS CERDOS PREPÚBERES Y VERRACOS JÓVENES	139
	4.8.1 CONCENTRACIÓN MINERAL EN BAZO OBTENIDOS DE CERDOS PREPÚBERES	139
	4.8.2. CONCENTRACIÓN MINERAL EN PÁNCREAS OBTENIDOS DE CERDOS PREPÚBERES	141
	4.8.3. CONCENTRACIÓN MINERAL EN HÍGADOS OBTENIDOS DE CERDOS PREPÚBERES	142
	4.8.4. CONCENTRACIÓN MINERAL EN RIÑONES OBTENIDOS DE CERDOS PREPÚBERES	144
	4.8.5. CONCENTRACIÓN MINERAL EN HUESO (FÉMUR) OBTENIDOS DE CERDOS PREPÚBERES Y VERRACOS JÓVENES	145
	4.8.6. CONCENTRACIÓN MINERAL EN TESTÍCULOS OBTENIDOS DE CERDOS PREPÚBERES Y VERRACOS JÓVENES	148
	4.8.7 CONCENTRACIÓN MINERAL EN EPIDÍDIMO OBTENIDOS DE CERDOS PREPÚBERES Y VERRACOS JÓVENES	150
	4.8.8 CONCENTRACIÓN MINERAL EN PLASMA SANGUÍNEO OBTENIDOS DE CERDOS PREPÚBERES Y VERRACOS JÓVENES	153
4.9.	EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DURANTE EL ENTRENAMIENTO DE VERRACOS JÓVENES	153
5.	DISCUSIÓN	159
5.1.	CONSUMO DE PIENSO EN CERDOS PREPÚBERES	159
5.2.	COSUMO DE PIENSO EN VERRACOS JÓVENES	162
5.3.	GANANCIAS DE PESO ENCERDOS PREPÚBERES	164
5.4.	GANANCIAS DE PESO EN VERRACOS JÓVENES	166
5.5.	CONVERSIÓN ALIMENTICIA EN CERDOS PREPÚBERES	167
5.6.	ÍNDICE GONADOSOMÁTICO DE VERRACOS JÓVENES	168
5.7.	ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS LEYDI, CÉLULA DE SERTOLI, PESO TESTICULAR, PESO VIVO Y CONCENTRACIÓN DE TESTOSTERONA EN CERDOS PREPÚBERES Y VERRACOS JOVENES	170
5.8.	CONCENTRACIÓN DE MINERALES EN TEJIDOS CERDOS PREPÚBERES Y VERRACOS JÓVENES	179

5.8.1 CONCENTRACIÓN MINERAL EN BAZO OBTENIDOS DE CERDOS PREPÚBERES Y VERRACOS JÓVENES	179
5.8.2 CONCENTRACIÓN MINERAL EN PÁNCREAS OBTENIDOS DE CERDOS PREPÚBERES Y VERRACOS JÓVENES	180
5.8.3 CONCENTRACIÓN MINERAL EN HÍGADOS OBTENIDOS DE CERDOS PREPÚBERES Y VERRACOS JÓVENES	180
5.8.4 CONCENTRACIÓN MINERAL EN RIÑONES OBTENIDOS DE CERDOS PREPÚBERES Y VERRACOS JÓVENES	181
5.8.5 CONCENTRACIÓN MINERAL EN HUESO (FÉMUR) OBTENIDOS DE CERDOS PREPÚBERES Y VERRACOS JÓVENES	182
5.8.6 CONCENTRACIÓN MINERAL EN TESTÍCULOS OBTENIDOS DE CERDOS PREPÚBERES Y VERRACOS JÓVENES	183
5.8.7 CONCENTRACIÓN MINERAL EN EPIDÍDIMO OBTENIDOS DE CERDOS PREPÚBERES Y VERRACOS JÓVENES	185
5.8.8 CONCENTRACIÓN MINERAL EN PLASMA SANGUÍNEO OBTENIDOS DE CERDOS PREPÚBERES Y VERRACOS JÓVENES	186
5.9. EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DURANTE EL ENTRENAMIENTO DE VERRACOS JÓVENES	187
4. CONCLUSIONES	189
7. RESUMEN	190
8. SUMMARY	194
9. ABREVIATURAS	198
10. BIBLIOGRAFÍA	201

SUMMARY

The use of sources of Zn (organic and inorganic) in feed for pigs prepubertal has proved essential, because this mineral has shown aspects related to reproductive, immune response, health, weight gain, feed consumption benefits. Early studies identified the Zn as an essential component in the reproduction were in the decade of the 40s, where the importance of this mineral was established in the development of Leydig cells, from the use of these findings is recommended ore in feed for pigs. However, the recommendations that have been made to support the effect of Zn on reproduction were identified 30 years ago, and little has been studied since about the level of Zn to be included in the feed. Moreover, the animal feed industry has it developed mineral springs with higher bioavailability, first for the body to use more quickly and efficiently (> bioavailability) and partly to prevent the ore consumed by the animal, be lost through droppings, thus ensuring not only the reduction of economic losses, but minimizing the environmental impact negatively Zn exercised. Thus, it was decided to conduct research that provides information on the effect of sources and levels of Zn in growth efficiency and development of prepubertal pigs and young boars in the development of the testes and their cell structures and in the sexual behavior of young boars. For the previous 50 pigs Landrace x York genetic line were used, with an initial average weight of 35 ± 1.25 , these animals were distributed in seven treatments, which corresponded to diets formulated with and without the addition of a source of Zn (ZnSO_4 , ZnO, ZnMet), and two levels (150ppm and 200ppm Zn). The basal diet was formulated using the table of nutritional needs FEDNA (2006). All pigs were placed in individual cages, with single trough and trough. They were given an adjustment period of 15 days, then the experimental phase where feed intake (CDP) was measured, feed conversion (CA), weight gain (GDP), was launched at the end of the breeding period (Growth, Development and Finishing pigs) and pigs reached a weight greater than 100 kg, three pigs, of which the testes, epididymis, spleen, pancreas, bone (femur), liver and kidneys were obtained were sacrificed to analyze through Atomic absorption spectrophotometry the concentration of Zn. Besides the testes tissue sections were obtained to analyze the development of Leydig cells (CL), Sertoli cells (CS) and seminiferous tubular diameter (DTS). Also, the gonadosomatic index (GI) was obtained. Subsequently, 35 young boars underwent a training process to start assessing the behavior of the boars reproductive life would begin. The results showed that the treatments did not behave differently in the CDP in prepubertal pigs ($P > 0.06$), but feed intake was increased in young boars ($P = 0.028$), identifying the $\text{ZnSO}_4 200$ reduced the CPD. The GDP showed differences between treatments ($P = 0.033$) and stage ZnO150 Growing the improved GDP. In the growth stage also it showed greater variability in GDP, indicating differences of up to 241g in average obtained by the ZnO source, identifying a difference ($P < 0.0001$) from inorganic sources. While the

development and completion period weight gains were similar between sources and levels of Zn. In the case of boars, a tendency ($P = 0.092$) was observed to improve ZnO200 weight. For AC no differences ($P = 0.362$) between treatments were obtained, and the values were in the order of 3.29 to 3.85 ($SEM = 0.171$), these values were higher than those shown in Development (3.17) and End (3.39). The PT was negatively affected by the ZnSO4200 ($P = 0.006$) in prepubertal pigs, but the ZnO and behaved like ZnMet sources. In the case of young boars nor differences in the PT ($P > 0.05$), which was in a range from 302g to 335g ($SEM = 0.038$) was observed, meanwhile the GI of prepubertal pigs was affected by ZnSO4200 ($P = 0.002$) as the value of this feature was 0.24. Meanwhile the treatments used ZnMet ZnO and showed values of IG equal ($P > 0.05$). As for young boars, the IG did not exceed 0.183 and no differences between treatments ($P > 0.05$) showed. The number of CL was reduced ($P < 0.05$) to use feed without Zn supplementation (Control) 28.5% in prepubertal pigs and 14.61% in young boars. The number of CL identified in prepubertal boars and young pigs was between 18 and 20 CL using Zn added to the feed. The effect of the source and level of Zn in the number of CL was not identified ($P > 0.05$). The concentration of [T] showed differences arising from the treatment. The concentration of [T] in the blood plasma of pigs prepubertal was 2.52ng 4.05ng mL⁻¹ mL⁻¹. Correlation analysis (r) showed that the number of CL has a degree of relation of 30%, and it was observed that ZnMet produced a positive effect on [T]. For his part, DTS showed equal for all treatments ($P = 0.331$) and in the two periods evaluated, being for prepubertal pigs between 112µm to 131µm, and boars 127.7µm to 140.20µm. These differences were significant ($P = 0.021$) between periods. Meanwhile the number of CS shown by prepubertal pigs identify an effect of applied treatments ($P < 0.0001$). Treatment Control CS had more abundant than other treatments (4.72 vs. 1.9) which included a source of Zn. Meanwhile Znet showed that using the CS 150ppm (150ppm 200ppm = 1.35 vs = 190; $P = 0.057$) decreased with .Siguiendo behavior prepubertal pigs, young boars also showed a reduction in the number of CS ($P = 0.050$) using the treatments containing any Zn source. Reducing CS values remained at 1.48 to 2.56, while the average treatment showed 4.12 Control CS. Also, no correlation ($P > 0.469$) between DTS and CS was observed, but if was observed between PT and DTS. Meanwhile the [T] he also correlated with DTS ($r < 0.347$; $P < 0.122$) and the number of CS ($r < 0.280$; $P > 0.218$). The Zn concentration obtained in the analyzed organs was presented differently, as the spleen, testes and blood plasma showed no difference ($P > 0.05$) because of the treatment provided, however, pancreas, liver, kidneys and bone (femur) evidenced differences in the concentration of Zn as the processing carried out. On the behavior of young boars during training dummy mount, you can note that it was not different ($P = 0.156$) and the number of training to which they were subjected young boars was the same, however the management of each boar was different because it had to be an interval of time for the male was introduced to the area of mounts, which caused the interval training

days were different ($P = 0.05$), especially in the broader ZnMet150 be observed due to the facility to be had with boars of this treatment, so they did not need more training intensity than the rest of the treatments.

1. INTRODUCCIÓN

La producción ganadera debe sustentarse en una correcta alimentación. El empleo de piensos seguros y regulados por las normativas garantizará la salud y el bienestar animal, así como protección para los consumidores y para el medio ambiente (**Pallaufy Müller, 2006**).

Un pienso con un nivel adecuado y equilibrado de nutrientes es vital para mantener una alta productividad y una buena salud en el ganado porcino. Sin embargo, cuando las reservas de nutrientes están agotadas o son excesivas, se producen alteraciones en los mecanismos de regulación que actúan en los animales.

La clave para minimizar la pérdida de estos nutrientes es proporcionar una alimentación de acuerdo a las necesidades de los animales. La subalimentación o el exceso de nutrientes, así como las necesidades de nutrientes por parte del animal, son puntos importantes a tener en cuenta, ya que el organismo excreta todos los nutrientes que no utiliza. Por ello, se requieren estimaciones precisas de las necesidades de nutrientes que permitan optimizar la producción porcina. Dichas estimaciones dependen de factores como la cantidad de energía del pienso, balance adecuado de aminoácidos y micronutrientes, etapa de producción, potencial genético, sexo del animal, estado sanitario y condiciones ambientales (**Murphy y de Lange, 2004; Rupičet al., 2004**).

Particularmente, el área de los micronutrientes ha sido poco estudiada siendo limitados los experimentos que consideran las implicaciones del efecto alimenticio de los minerales en el crecimiento y desarrollo de la vida reproductiva de un animal. Sin embargo, debido a que las vitaminas y minerales son nutrientes esenciales para los cerdos y dada la escasa disponibilidad que aportan las materias primas con las que se formulan los piensos, así como la gran variabilidad tanto en los granos como en los demás ingredientes, estos deben incorporarse en la alimentación, para cubrir las necesidades de los cerdos acorde a su etapa productiva.

En la práctica común, estos micronutrientes son mezclados en el pienso y representan en el alimento aproximadamente un 0.10, 0.15 y 0.30% para las fases de crecimiento-engorde, cerdas y lechones, respectivamente. Sin embargo, la mayoría de las premezclas comerciales superan los niveles requeridos por los animales para cubrir sus

necesidades fisiológicas, de tal manera que muchos piensos exceden con creces las recomendaciones publicadas por diferentes organismos como **el NRC, 1998; BSAS, 2003; FEDNA, 2006; NSNG, 2010**, entre otros (**Creechet *al.*, 2004; Burkett *et al.*, 2009; Gaudré y Quiniou, 2009; Martin *et al.*, 2011**).

Los microminerales constituyen un pequeño porcentaje de la dieta, pero su importancia para la salud y bienestar de los cerdos no debe ser sobrevalorada, ya que desempeñan funciones bioquímicas bien definidas como son, la activación de muchas enzimas, mantienen el equilibrio iónico y el pH, e intervienen como sustancias de señalización intracelular y regulación en la homeóstasis metabólica, por lo que deben estar presentes en el pienso en cantidades apropiadas. Dentro de estos nutrientes se encuentra el Zinc (**Zn**) el cual, tiene un papel fundamental en el crecimiento, desarrollo y en una gran cantidad de funciones involucradas en los procesos de integridad, división y crecimiento celular, así como en la maduración sexual y por tanto en la reproducción (**Creechet *al.*, 2004; Rupičet *al.*, 2004; Favier y Hininger-Favier, 2005**).

Durante las últimas décadas, la importancia biológica del **Zn** ha sido el objetivo de diversas investigaciones, debido a su papel tanto en el organismo, como su influencia en el medio ambiente. Las necesidades mínimas de **Zn** varían con la forma química de la fuente, la cantidad utilizada y con los ingredientes que se utilicen para la formulación del pienso. Dichos ingredientes se clasifican según su origen o tipo, lo cual está directamente relacionado con la biodisponibilidad de la fuente mineral utilizada, la capacidad de absorción en el tracto gastrointestinal y la interacción con otros minerales y con componentes antinutritivos del pienso (**Rupičet *al.*, 2004; Schlegel y Windisch, 2006; Khan *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2011**).

El **Zn**, ya sea aportado por una fuente orgánica o inorgánica puede provocar toxicidad cuando se administra a niveles superiores a 1000ppm durante largos periodos de tiempo (varios meses, dependiendo de la edad y peso del animal), indistintamente de la fuente utilizada. En general, el efecto de suplementar los piensos para cerdos con diferentes niveles y fuentes minerales sobre las respuestas de rendimiento, retención en tejidos y actividades enzimáticas específicas asociadas a estos microminerales, aún no está bien determinado (**Mavromichalis, 2010; Martin *et al.*, 2011**).

La mayoría de las investigaciones realizadas han utilizado principalmente fuentes inorgánicas, dietas purificadas o semi-purificadas, así como cerdos genéticamente diferentes a los utilizados hoy en día, con lo cual, la información acerca de las necesidades minerales para los genotipos actuales es mínima o inadecuada (**Close, 2002; Balfagón-Romeo, 2006; Kim y Lindemann, 2007; Martin et al., 2011**). No obstante, durante la última década los minerales orgánicos han recibido mayor atención. Aunque su modo exacto de acción sigue siendo prácticamente desconocido. Los resultados de algunos estudios señalan que los minerales orgánicos pueden ser más biodisponibles que los inorgánicos, observado mejoras en el rendimiento de los animales (**Wedekind et al., 1992; Spears, 1996**). Sin embargo, se ha evaluado el efecto de minerales orgánicos e inorgánicos, encontrando en cerdos resultados similares (**Schiavone et al., 2000; Creech et al., 2004; Burkett et al., 2009; Martin et al., 2011; Patience y Chipman, 2011**).

La retención corporal de **Zn** en el cerdo es muy baja sólo de 22mg/Kg^{-1} del peso corporal, debido a que casi todo el mineral es excretado. La concentración de **Zn** plasmático es inferior a 0.4mg/L^{-1} , por lo que la especie porcina es considerada deficiente en **Zn**.

Dado que la concentración de minerales es altamente regulada por los mecanismos homeostáticos, grandes cantidades de estos minerales son excretados. En el caso particular del **Zn**, en las heces se excreta un (70-80%), y en orina y/o fluidos corporales (15-25%), con lo que la eliminación media es del 1% de la dosis absorbida. El contenido aproximado de **Zn** en músculos y huesos es de 85%, en hígado de 11%, en el resto de tejidos de 2-3% y en plasma $80\text{-}90\mu\text{g/L}^{-1}$. Por ello, el equilibrio entre minerales, en lo que respecta a las concentraciones de la dieta y su relación con los requerimientos del animal, es un factor importante que afecta a su utilización. Además esta eliminación puede conducir a la bioacumulación en el suelo y ser una amenaza potencial por ejemplo, para las aguas subterráneas (**Jondreville et al., 2003; Creech et al., 2004; Berger, 2006; Burkett et al., 2009**).

En este contexto, el contenido máximo de **Zn** (proporcionado por los ingredientes del alimento y/o la suplementación), autorizado en la Unión Europea se ha reducido de 250 a 150mg/Kg^{-1} indistintamente de la fuente utilizada, dicha disposición está señalada en la normativa No.1334/2003 del Official Journal of the European Union (**Revy et al., 2003; Gaudré y Quiniou, 2009**).

Estas concentraciones que corresponden a los considerados "márgenes de seguridad" en la utilización de **Zn**, generalmente se utilizan para minimizar el impacto ambiental y mejorar la producción porcina sostenible, estrategias que son parte de la legislación en muchos de los países productores de cerdos en el mundo. Es importante establecer el valor relativo de los ingredientes utilizados para la formulación de los piensos en la industria porcina, debido a que los costes de alimentación representan entre el 60% al 70% del total de la producción y por lo tanto, tienen un gran impacto en la rentabilidad, por lo que, la variabilidad en la composición de los ingredientes, la biodisponibilidad de nutrientes, presencia de inhibidores o toxinas, elaboración o mezcla inadecuada de los piensos, pérdida parcial de nutrientes debido al almacenamiento, y otros factores son considerados para reducir la excreción excesiva de nutrientes en las heces de los animales, mejorando la eficacia de la producción porcina y disminuyendo el deterioro del medio ambiente (**NRC, 1998; Balfagón-Romeo, 2006; HarperryForsyth, 2006; Hernández, 2006**).

Sin embargo, estos beneficios no siempre se han demostrado. La implementación de estrategias nutricionales que permitan reducir la excreción de estos minerales, incrementa la necesidad de valoraciones más precisas del contenido de nutrientes disponibles en los ingredientes utilizados en la formulación de los piensos. Una maniobra utilizada para reducir estas concentraciones, es la inclusión de fuentes minerales que presenten una mayor biodisponibilidad. Esto implica, la necesidad de mayores investigaciones para poder definir los requerimientos nutricionales y niveles óptimos de inclusión de Zn en cerdos durante las diferentes etapas de producción (**Murphy y de Lange, 2004; Hernández, 2006; Burkett *et al.*, 2009**).

En la actualidad, las investigaciones se han encaminado en conocer los mecanismos involucrados en el efecto que aporta la nutrición directamente en las características reproductivas de los animales. Algunos autores sostienen que cualquier problema reproductivo tiene su base en un problema nutricional en menor o mayor medida (**Fabré, 2011**). Por ello, los avances en el campo de la nutrición y su influencia sobre los parámetros reproductivos son de gran interés para mejorar la productividad de una explotación.

Aunque muchos factores pueden reducir el rendimiento y la salud en los cerdos jóvenes, algunos nutrientes de la dieta como el **Zn**, pueden contrarrestar estos efectos ya que se ha demostrado que tiene efectos beneficiosos (**Hill et al., 2000**).

El **Zn** es importante en el desarrollo y función del sistema reproductivo masculino, ya que:

- » Afecta el desarrollo y densidad de los túbulos seminíferos, tamaño y peso de los testículos.
- » Estimula la esteroidogénesis, debido a que los mecanismos de regulación hormonales son dependiente de **Zn²⁺**.
- » Favorece la aparición de la pubertad, la libido y madurez sexual.
- » Actúa en la diferenciación y producción de células germinales (células de Leydig).
- » Participa en la espermatogénesis.
- » Interviene en la modulación del movimiento de los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo.
- » Inhibe la entrada de **Ca²⁺** en el espermatozoide, previniendo la capacitación prematura.
- » Su presencia en el plasma seminal (altas concentraciones), aporta una función protectora (antioxidante), desactivando el efecto de los radicales libres (**ROS**).
- » Como parte de las enzimas antioxidantes (**SOD**) protege a los espermatozoides del estrés oxidativo.

No obstante, las deficiencias de micronutrientes tienen un impacto negativo en la reproducción. Al seleccionar cerdos como futuros reproductores, se deben tener en cuenta una serie de características como la nutrición, genética, edad, estación del año, cambios en los componentes de la función reproductiva en verracos jóvenes, además de diversos factores como el manejo de los animales, profilaxis, toxinas, alteraciones en el metabolismo de los nutrientes, factores fisiológicos y bioquímicos, que permitan maximizar el rendimiento productivo del animal.

Además, la información existente acerca de la nutrición del verraco es insuficiente y escasa por lo que, la implementación de nuevos conocimientos sobre las respuestas del suministro de nutrientes en la reproducción, requiere una proyección de las consecuencias a largo plazo para el bienestar general de los animales desde las etapas tempranas de crecimiento hasta alcanzar el desarrollo de su vida reproductiva (**Robinson, 1990**).

Entre las necesidades de la porcicultura actual se encuentra, el uso de fuentes minerales que permitan mejorar el comportamiento productivo de los animales sin afectar al medio ambiente, así como la inclusión de **Zn** en el pienso de cerdos no castrados para mejorar su desarrollo reproductivo. Por todo lo mencionado anteriormente, los objetivos planteados en la presente investigación fueron:

1.1. Objetivo General.

- Determinar el efecto de tres fuentes de **Zn** (**ZnSO₄**, **ZnO**, **Zn-Met**) a dos niveles (150 y 200ppm) en el comportamiento productivo (Consumo de Alimento (**CA**), Conversión Alimenticia, Ganancia de Peso, días a 110Kg) de machos no castrados de 40 a 110Kg de peso vivo y su relación con el comportamiento sexual mostrado al inicio de su actividad reproductiva.

Con lo que, para el cumplimiento del objetivo general se desarrollaron tres fases experimentales en las cuales se establecieron como objetivos específicos los que a continuación se señalan:

1.1.1. Objetivos Específicos.

- Establecer el peso final de cerdos no castrados, alimentados con piensos formulados con diferentes fuentes y niveles de **Zn**.
- Evaluar el efecto de las fuentes y niveles de **Zn** en la morfometría y composición química de órganos sexuales (testículos) de machos no castrados.

- Determinar la concentración de **Zn**, en tejidos de cerdos no castrados alimentados con diferentes fuentes y niveles de **Zn**.
- Valorar la concentración de la hormonal Testosterona en machos no castrados alimentados con piensos que contienen distintas fuentes y niveles de **Zn**.
- Cuantificar el número de células de Leydig por testículo, de machos tratados con diferentes fuentes y niveles de **Zn**.
- Correlacionar la morfometría testicular y concentración hormonal con el comportamiento sexual de machos no castrados, que inician su actividad sexual.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Los Minerales en la Alimentación Animal

Los minerales son elementos esenciales para la nutrición animal, ya que en el organismo intervienen en un gran número de funciones: formación de tejidos, procesos metabólicos, reacciones bioquímicas, procesos de absorción, transporte de nutrientes, protección celular, regulación de genes, transducción de señales, producción hormonal, así como en procesos reproductivos (**Hostetler et al., 2003; Araújo et al., 2007; Hänsch y Mendel, 2009**).

El equilibrio entre los minerales como componentes de la dieta, concentración y relación con las necesidades de nutrientes de los animales, son factores que afectan su utilización (**Creech et al., 2004**). La mayor parte de los minerales que son consumidos por los animales proviene de los alimentos y forrajes que ingieren. Esta cantidad de minerales está influida por factores que determinan el contenido y la concentración de micronutrientes existentes en plantas y semillas tales como: el genotipo de la planta, el ambiente, etapa de madurez de los cultivos, uso de fertilizantes, riego y rotación de cultivos, entre otros (**Suttle, 2010**).

El organismo necesita adquirir cantidades apropiadas de cada micronutriente para formar una red homeostática de procesos que conlleve a la movilización, captación, distribución, tráfico intracelular, almacenamiento y aprovechamiento de dichos nutrientes (**Hänsch y Mendel, 2009**).

Durante la última década del siglo 20 se desarrolló la mayor aplicación de la biología molecular a los estudios del metabolismo, función y mecanismos complejos por los cuales los minerales son transportados de forma segura a través de las membranas celulares, así como los mecanismos de su incorporación en las moléculas orgánicas intracelulares (**Suttle, 2010**).

Diversos iones metálicos están considerados como esenciales, principalmente por su actividad redox-activa, debido a que intervienen como cofactores catalíticamente activos de muchas metaloenzimas. Sin embargo, cuando están presentes en cantidades elevadas, estas propiedades redox pueden conducir a la formación de especies reactivas de oxígeno (**ROS**), teniendo efectos negativos en la célula (**Hänsch y Mendel, 2009**).

Todos los tejidos animales contienen entre 20 a 30 elementos minerales, en concentraciones pequeñas y variables que probablemente son constituyentes eventuales, producto del contacto con un ambiente químicamente diverso (**Suttle, 2010**).

Se ha demostrado que los minerales necesarios para complementar los piensos de los animales son: Cobalto (**Co**), Cobre (**Cu**), Cromo (**Cr**), Hierro (**Fe**), Manganese (**Mn**), Selenio (**Se**), Yodo (**I**) y Zinc (**Zn**). Estos se necesitan en cantidades muy pequeñas, por ello, la necesidad se expresa en cantidades por día oportunidad de producto en partes por millón (**ppm**) o miligramos por kilogramo (**mg/Kg⁻¹**) del pienso en materia seca (**Hellman y Carlson, 2003; Hostetler et al., 2003; Suttle, 2010**).

Los minerales participan en cuatro tipos de funciones que son fundamentales en los tejidos (**Tabla 1**).

Tabla 1. Funciones de los minerales

Estructurales	Fisiológicas	Catalíticas	Reguladoras
Componentes estructurales de órganos y tejidos.	Mantenimiento de la presión osmótica	Catalizadores de sistemas enzimáticos y endocrinos	Regulan la replicación y diferenciación celular
Estabilidad de moléculas y membranas	Equilibrio ácido-base.	Integrantes específicos de las metaloenzimas, hormonas	Mecanismos de los genes de transcripción
	Permeabilidad de membranas	Actúan como coenzimas	Transducción de genes
	Transmisión de impulsos nerviosos	Tienen actividad anabólica o catabólica	
		Pueden actuar como oxidantes o antioxidantes	

Fuente: **Falchuk, 1998; Araújo et al., 2007; Jing et al., 2007; Hänsch y Mendel, 2009; Suttle, 2010; Tran et al., 2011; Kambe et al., 2015.**

Algunos minerales tienen similitudes químicas y pueden competir por proteínas de transporte, mecanismos de absorción, o por sustancias orgánicas quelantes que faciliten u obstaculicen su absorción. Las consecuencias cuantitativas de estas interacciones dependerán de las concentraciones relativas de los minerales. Las deficiencias de estos micronutrientes, pueden afectar a los mecanismos específicos necesarios para la absorción de otros minerales (**Sandström, 2001**).

De forma general, los minerales tienen distintas interacciones (**Ashmead, 1993**) que pueden interferir o coadyuvar su utilización en el tracto digestivo. Estas interacciones pueden ser descritas como:

- a. Interacciones que producen precipitados insolubles. Las sales son por lo general solubles en el estómago a pH ácido. Sin embargo, como el pH se incrementa en el intestino, la solubilidad se pierde, y el metal tiende a unirse a un anión o ligando, por ejemplo: un compuesto orgánico como el ácido fítico o un compuesto inorgánico, como los fosfatos.
- b. Existe una competencia entre iones por el mecanismo de transporte activo de las células del lumen intestinal, para llegar hacia el citoplasma de las células intestinales. Debido a que los iones que se unen a las proteínas transportadoras para ser absorbidos pueden tener una competencia físico-química entre cationes por los sitios activos de las proteínas transportadoras (**Iguchi et al., 2004; Cousins et al., 2000**).
- c. Reducción de la capacidad de las células del cuerpo para sintetizar proteínas transportadoras (genes transportadores **Zip, ZnT, MT**). La sustitución de un mineral por otro metal en una enzima, por ejemplo, puede acelerar o bloquear la actividad de la enzima.
- d. Bloqueo por el transporte y la excreción de minerales en las células de la mucosa intestinal por procesos patológicos.
- e. Participación de interacciones y reacciones en cadena como consecuencia de los eventos descritos anteriormente (**Hernández, 2006**).

Las funciones de los minerales sólo pueden realizarse si una cantidad suficiente es ingerida por el organismo, se absorbe y se conserva para mantener el ritmo de crecimiento, desarrollo, reproducción, mantenimiento y para que el animal restablezca los nutrientes "perdidos" en la elaboración de productos como la leche, huevos, crecimiento de pelo, lana etc. Las cantidades de estos minerales utilizados para dicha producción, debe ser suficiente para optimizar la calidad, así como la cantidad de producto (**Suttle, 2010**).

Las proteínas reguladoras contienen más de un átomo de un mineral, el número exacto y/o la posición de los átomos determinará la función de estos. Existen estudios que ponen de manifiesto que la adición de minerales en el pienso presenta beneficios en la productividad.

La absorción de minerales es a menudo una gran limitante para su utilización, debido a que depende de la capacidad productiva de la especie o raza, y principalmente de la biodisponibilidad del mineral. Los animales pueden adaptarse a una ingesta

subóptima, mediante la reducción de la concentración de minerales en los tejidos o productos (**Pallauf y Müller, 2006; Acda y Chae, 2002; Suttle, 2010**).

Las interacciones entre los micronutrientes podrían tener lugar cuando se suministran altas dosis de un solo nutriente o cuando la administración es inadecuada. Las interacciones nutrición-mineral entre el **Fe**, **Zn** y **Cu** parecen ser especialmente importantes. En los programas de suplementación de minerales es trascendental tener en cuenta los riesgos potenciales de las interacciones entre iones, especialmente cuando están dirigidos a grupos de animales con elevadas necesidades de micronutrientes dependiendo de la fase productiva a la que están destinados (**Sandström, 2001**).

Por otra parte debemos destacar que la nutrición y alimentación de los verracos de forma tradicional ha recibido escasa atención, por lo que la información científica y práctica para balancear de forma correcta el pienso de estos reproductores es insuficiente y variable. Por lo tanto la investigación del efecto nutricional de minerales y vitaminas, es cada día más necesaria, debido a la evolución genética tan rápida que se tienen en los machos, principalmente en los indicadores reproductivos (**Kemp et al., 1989; Audet et al., 2004; Estienne y Harper 2005**).

Por tanto, la nutrición mineral para verracos debería ser evaluada a través de tres aspectos productivos fundamentales:

- a) El desarrollo de órganos reproductores primarios y secundarios para un funcionamiento adecuado de los mismos.
- b) Potenciación de la producción de eyaculados de calidad.
- c) La capacidad de producir altas tasas de fertilidad y fecundidad.

Sin embargo, no hay que olvidar que todos ellos deben estar relacionados con el aumento de su longevidad en función de la eficiencia reproductiva y del menor impacto ambiental que se obtenga (**García-Contreras, 2010**).

Uno de los microminerales más importante involucrado con la capacidad reproductiva del verraco es el **Zinc (Zn)**. Normalmente, está presente en el pienso, pero su biodisponibilidad dependerá de la fuente, concentración de fitatos, edad, sexo y actividad de los animales (**Acda y Chae, 2002**).

2.2. Características Físicas y Químicas del Zinc

El Zn es un catión divalente, incoloro, diamagnético, de tamaño pequeño con un radio de 0.069nm, tiene una vida media biológica aproximada de 100-500 días, no sufre reacciones de óxido-reducción (**redox**), forma complejos con las moléculas de nitrógeno (**N**), azufre (**S**) y oxígeno (**O**) en las cadenas laterales de los aminoácidos para crear una estructura terciaria estable que le otorga estabilidad y estructura a las proteínas, determinando con ello, el tipo de proteína formada por las células (**Christianson, 1999; Falchuk, 1998; Ebert y Altman, 2008; Jackson et al., 2008**). Está involucrado en procesos de transferencia de electrones, pero debido a su carga eléctrica, no puede cruzar las membranas biológicas por mecanismos de difusión pasiva (**Hortin et al., 1993; McMahon y Cousins, 1998**). Los sitios activos de un gran número de enzimas tienen un centro de **Zn** tetraédricamente coordinado, el cual se acopla a una proteína por cada tres residuos de aminoácidos y el cuarto corresponde a una molécula de agua. Esta unión, interviene en la función específica de la enzima, la cual es determinada por la naturaleza de los residuos de **Zn** que se unen a proteínas como la Histidina (**Hys**), Cisteína (**Cys**), Glutamina/Ácido glutámico (**Glu**) o Ácido aspártico (**Asp**), es decir: (**Hys(N); Cys(S); Glu(O)** y **Asp(O)**), así como por la longitud de cadenas de aminoácidos entre los residuos del sitio activo de la enzima (**Parkin, 2000**). Se ha demostrado que este ion es un potente inductor de proteínas endógenas vinculantes llamadas metalotioneínas (**MT**), siendo un grupo de isoformas de peso molecular bajo (6000-7000kDa) que actúan como proteínas de unión-metal. Contienen alrededor de 60 a 68 residuos de aminoácidos de los cuales un 25-30% es cisteína. No contienen aminoácidos aromáticos o puentes disulfuro, pero pueden unirse de 5-7g de **Zn** mol/proteína. Las **MT** están consideradas como un indicador intracelular de la presencia de excesos de **Zn** en las células. Además, controlan la cantidad de **Zn** que ingresa al organismo y se traslada a la circulación portal (**Ebadi et al., 1996; Powell, 2000; Brzóska y Moniuszko-Jakoniuk, 2001; Martínez et al., 2004; Formigari y Irato, 2007; Tran et al., 2011**).

A este ion metálico, se le reconoce como una molécula de señalización intracelular, por lo que se le ha dado el nombre de “**Segundo Mensajero**”, calificativo otorgado a una molécula intracelular cuya situación está directamente alterada por estímulos extracelulares y que puede transmitir los estímulos extracelulares en eventos de señalización intracelular (**Yamasaki et al., 2007; Fukada et al., 2008**).

Debido a las importantes funciones que desempeña el **Zn**, es considerado como un elemento esencial para la vida. Este micronutriente, desde el punto de vista fisiológico

es crítico porque posee propiedades multifuncionales, interviene en un gran número de rutas bioquímicas y tiene una función biológica importante ya que está presente en el núcleo de la célula, en el nucléolo y en los cromosomas, aportando estabilidad a la estructura del **ADN**, **ARN** y ribosomas (**Abdel-Mageed y Oehme, 1990a; Brandao-Neto et al., 1995; Falchuk, 1998; Semrad, 1999; Hambidge, 2000; Brzóska y Moniuszko-Jakoniuk, 2001; Maret, 2001; Cámara y Amaro, 2003; Jing et al., 2007; Johnson et al., 2011**).

2.3. Actuación del Zn en el Organismo.

2.3.1. Absorción y Metabolismo

El papel que desempeña el **Zn** en el control del apetito es multifactorial. El patrón y la tasa de ingestión de alimento puede verse afectado por el exceso o falta de **Zn** en la dieta. Por lo tanto, el primer sistema del control homeostático de **Zn** en el organismo es el gastrointestinal (**Hernández, 2006; Suttle, 2010**).

La absorción de **Zn** se produce principalmente en el duodeno (58%), siendo en yeyuno e íleon del 10 y 30% respectivamente. Los mecanismos de absorción del **Zn** exógeno han sido poco estudiados, aunque se admite que este proceso se compone de dos fases (**Hara et al., 2000; Klasing et al., 2005**):

- a. Absorción insaturable, no es afectada por la ingesta de **Zn** en el pienso.
- b. Absorción saturable, se estimula por la disminución en el consumo de **Zn**.

La existencia de estos procesos de saturación-insaturación del mineral son los responsables de intentar establecer la homeóstasis metabólica del mineral (**Krebs, 2000**), y que al estar relacionadas directamente con el consumo de **Zn**, están afectadas por la biodisponibilidad de las diferentes fuentes de **Zn**, las necesidades del organismo y la excreción endógena del mineral (**Cousins, 1996; Klasing et al., 2005; Pallauf y Müller, 2006**).

La absorción del **Zn** a nivel intestinal ocupa sistemas de transporte activo saturable, así como un proceso no-saturable de difusión pasiva. Este proceso depende del gradiente de concentración del catión **Zn** que esté disponible para su absorción (**Ilustración 1**).

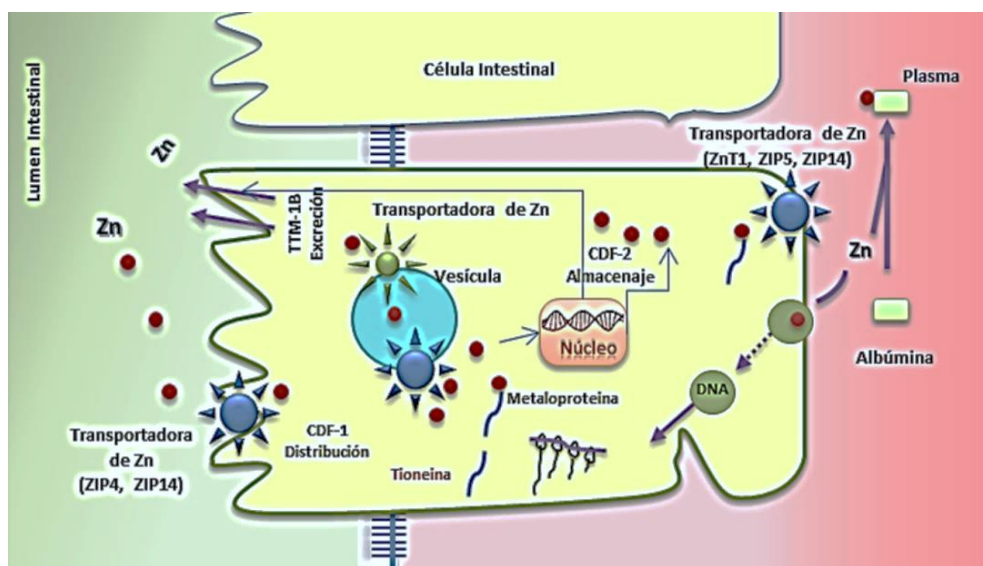


Ilustración 1. Absorción de Zn por las células intestinales.

La absorción del **Zn** está inversamente relacionada con el consumo del mismo, a través de la dieta. La capacidad de absorción intestinal es alta cuando se consumen bajos niveles de **Zn**. Se sabe que cuando se consumen mayores niveles de mineral, hay una disminución en la eficiencia de absorción pero un aumento en la cantidad total de **Zn** absorbido. El **Zn** ingerido a través de la dieta se difunde por la luz intestinal hacia el citoplasma, con la ayuda de los **CDFs** (Distribuidores de cationes), los cuales actúan como transportadores de **Zn** en las células intestinales y se encuentran principalmente en las membranas de las microvellosidades, cuentan con seis dominios transmembranales. Estas proteínas transportan **Zn** y/u otros metales desde el citoplasma hacia el lumen del intestinal o el exterior celular y participan en la detoxificación y/o acúmulo de metales (distribución y almacenamiento de **Zn**). El mecanismo de excreción de **Zn** de las células se realiza mediante una proteína reguladora (**TTM-1B**), la cual se localiza en la superficie apical de la membrana plasmática de las células intestinales. Las **TTM-1A**, actúan principalmente en las vesículas de la célula y promueven la excreción de **Zn** o su retención en la célula. El **ZnT1** es el transportador más importante en el control de salida de **Zn** hacia el lumen intestinal. Se habla de una ruta potencial para la liberación de **Zn** endógeno en el tracto gastrointestinal, la cual se lleva a cabo de la serosa a la mucosa, con una eventual liberación de **Zn** en el lumen intestinal.

Modificado y adaptado de Cousins *et al.*, 2010; Jou *et al.*, 2010; Roh *et al.*, 2013.

Por lo tanto, se cree que existen múltiples factores que influyen en la absorción de **Zn**:

- El aumento de la concentración de **Zn** satura el sistema de transporte activo.
- La tasa de absorción de la mucosa intestinal puede verse reducida debido a procesos patológicos.
- La presencia de otros cationes divalentes (Ejemplo: **Calcio**) los cuales compiten por el canal no específico de **Zn**, llamado canal polivalente (Klasing *et al.*, 2005; Molokwu y Li, 2006).

Por lo que, la absorción y retención de este mineral, es mayor durante los procesos de crecimiento de un organismo, que durante la etapa de desarrollo (**Klasing et al., 2005**). La eficiencia en la absorción de **Zn** puede variar entre un 15% a más del 60%.

El proceso de homeóstasis de **Zn** en la célula, se controla a través de los mecanismos de absorción, eliminación y retención intracelular, estando asociados con la expresión de genes transportadores de **Zn** y con **MT** (**Iguchi et al., 2004; Cousins et al., 2006**).

Las **MT** son proteínas citosólicas con un alto contenido de cisteína (se unen siete átomos de **Zn** por molécula de **MT**), interviene como factor de regulación del transporte de **Zn** por la mucosa, actuando como destoxicante, además de intervenir en el almacenamiento de **Zn** (**Cámara y Amaro, 2003**). La **MT** desempeña un papel importante como antagonista entre la absorción de **Cu** y **Zn** (**Ilustración 2**).

La interacción de micronutrientes puede afectar la absorción y biodisponibilidad de los mismos, ya que minerales con similitudes químicas pueden competir por las proteínas de transporte u otros mecanismos de absorción. Las consecuencias cuantitativas de estas interacciones dependerán de las concentraciones relativas de nutrientes (**Brzóska y Moniuszko-Jakoniuk, 2001; Sandström, 2001**).

Las deficiencias en oligoelementos pueden interferir en la absorción de **Zn**, así como intervenir en los mecanismos específicos necesarios para la absorción de otros micronutrientes. La presencia de fitatos en la dieta reduce la disponibilidad de **Zn**, por lo que su absorción se ve afectada. Sustancias orgánicas quelantes facilitan u obstaculizan dicha disponibilidad de **Zn**, mientras que determinados aminoácidos (**Hys** y **Cys**) mejoran su absorción (**Sandström, 2001; Klasing et al., 2005; Nitrayova et al., 2012**).

Una vez absorbido el **Zn**, es transportado principalmente por la albúmina del plasma sanguíneo, interviniendo algunas proteínas vinculantes como la transferrina, alfa-2-macroglobulina, glicoproteínas, y tal vez en pequeñas proporciones la **MT**. El porcentaje de **Zn** transportado por estos elementos es variable, la albúmina 57%, alfa-2-macroglobulina 40%. El **Zn** también se une a aminoácidos (3%), con los cuales, forma complejos **Zn-Cys** o **Zn-Hys**. Se considera que el porcentaje de **Zn** que se absorbe por los organismos dependerá de la dosis y presencia de factores inhibidores o facilitadores (**King y Keng, 1994; Cousins, 1996; Terrés, 1999**).

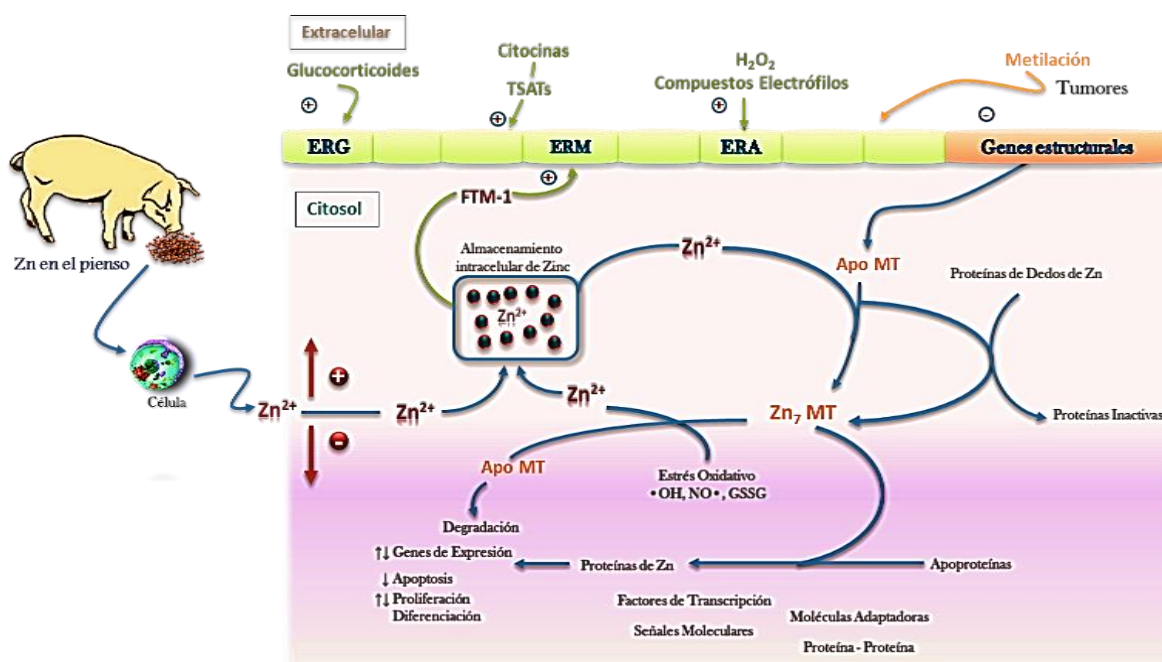


Ilustración 2. Metalotioneína (MT), función y regulación de genes.

La participación de zinc en la expresión génica y la síntesis de proteínas han recibido considerable atención, la regulación de esta expresión de genes por efecto de un nutriente como el **Zn**, requiere de su acción directa sobre el genoma o la participación de mecanismos indirectos de otro sistema de mensajeros de transporte. La expresión de **MT**, está estrechamente regulada por el suministro dietético de **Zn**, este mineral ejerce control sobre los genes **MT** influyendo en la concentración o flujo intracelular de **Zn** así como en la interacción con otros factores de transcripción. La metilación es un proceso químico (proceso epigenético) que participa en la regulación de la expresión génica, debido a que puede reducir la expresión de algunos genes o células malignas. Los ligandos de **Zn-MT**, representan una elevada estabilidad termodinámica y alta labilidad cinética. Los elementos de respuesta al metal (**ERM**) activan factores de transcripción como los **MTF-1** después del ingreso de **Zn** a la célula, intervienen elementos de respuesta a glucocorticoides (**ERG**), transductores de señal y activadores de transcripción (**STAT**), señalización mediante Citosinas, elementos antioxidantes para la activación de la respuesta redox. Por lo tanto, la **MT** influye directamente en procesos fisiológicos que incluyen la regulación de genes, la proliferación y diferenciación celular, señal transducción y la apoptosis, así como daño oxidativo a causa de estrés oxidativo.

Modificado y adaptado de Cousins y Lee-Ambrose 1992; Davis y Cousins 2000.

2.3.2. Almacenamiento y Excreción de Zn

La forma en que se distribuye el **Zn** en las células dependerá en mayor o menor medida de las necesidades del organismo (Linder, 1989). La distribución de este mineral en todo el cuerpo se realiza a través de las vesículas citoplásmicas (**zincosomas**), y la concentración puede variar entre especies. El nivel de **Zn** almacenado está más relacionado con la cantidad que con la fuente de **Zn**, ya que la expresión de **MT** se incrementa en los animales que consumen mayor nivel de este mineral (Hernández,

2006). Asimismo, el hecho de que las células entren en fase estacionaria permite que la concentración de **Zn** no cambie. Bajo estas condiciones, se han encontrado de 600.000 a 3 millones de átomos de **Zn** por célula (**Regalla y Lyons, 2005**).

En un estado carencial, los primeros sitios de almacén que pierden **Zn** son los zincosomas del hígado, riñón y páncreas respectivamente. En el caso de los estados de almacenamiento, estos pueden variar debido a la edad de los animales y a la fuente de **Zn** utilizada. Se ha demostrado que fuentes orgánicas de **Zn** se almacenan en mayor proporción en órganos como hígado, bazo, corazón e intestino delgado, que cuando se utilizan fuentes inorgánicas en el pienso (**Spears, 1996; Krebs, 2000**). A este respecto, **Rojas et al. (1995)** observaron que el **Zn** de la fuente orgánica **Zn-Lis** se almacena en cantidades altas en estos tejidos, pero con predilección en hígado como principal órgano metabólico (gran cantidad de enzimas dependientes de **Zn**), restándole importancia a los otros órganos (**Krebs, 2000**).

Se señala que altas concentraciones del mineral están presentes en las células β del páncreas, favoreciendo el almacenamiento de la insulina, el iris, pulmón y retina del ojo, (interacción con la enzima superóxido dismutasa) y en los tejidos reproductivos como la próstata (**Brzovic et al., 1994; Ho, 2002; Mosenthin et al., 2006**).

Aunque, el aparato reproductor no suele almacenar grandes cantidades de **Zn**, su contenido mineral se ve afectado por el consumo y la absorción. A medida que aumenta el consumo de **Zn**, aumenta la concentración en los testículos, epidídimo y próstata así como en sus secreciones. En el caso de los testículos, cuando una dieta es baja en **Zn** suelen generar una disminución aproximadamente del 11% de este mineral en el parénquima (**Evenson et al., 1993**).

Algunas investigaciones señalan que el consumo de **Zn** regula la excreción de este mineral, ya que consumos extremadamente altos, no incrementan proporcionalmente la cantidad de **Zn** en los tejidos, debido a que el mineral es excretado por su principal ruta de eliminación endógena. El tracto gastrointestinal elimina del 2% al 10% del **Zn** por orina, mientras que el resto, lo hace vía heces, siendo este el primer mecanismo homeostático del **Zn**, el cual permanece activo durante el periodo de tiempo que continúe el suministro (**Krebs, 2000**).

Las pérdidas fecales de **Zn** son una combinación del mineral consumido a través del pienso y que no es absorbido y otra parte de las secreciones endógenas de este

mineral (**Terrés, 1999**). La excreción de **Zn** también se realiza por otras vías como el sudor, descamación de la piel, pérdidas de cabello, semen. Por otra parte, el hígado, páncreas e intestino se convierten en mecanismos de excreción de **Zn**, evitando en el organismo la toxicidad del mismo (**Cousins et al., 2006**).

2.4. Funciones del Zn

Este mineral, tiene un papel crucial en las funciones biológicas, ya que es esencial en la expresión génica, síntesis de proteínas (**ADN** y **ARN**), metabolismo de los ácidos grasos insaturados, sistema inmunológico, producción de la hormona del crecimiento (**GH**), somatomedina-C, fosfatasa alcalina, colágeno, osteocalcina, almacenamiento y liberación de insulina, así como testosterona, tiroides, y vitamina D. Además, interviene en el crecimiento y desarrollo del organismo, debido a que regula el consumo de alimento y mejora las características reproductivas, participando en los procesos de maduración sexual (**Brzóska y Moniuszko-Jakoniuk, 2001; Maret, 2001; Hellman y Carlson, 2003; Favier y Hininger-Favier, 2005; Andreini et al., 2006; Maret et al., 2009; Johnson et al., 2011**).

2.4.1. Regulador de la Expresión Génica

Las funciones del **Zn** son extraordinariamente diversas, desempeña un papel importante en la expresión génica, ya que participa en los factores de transcripción (aproximadamente 2000 factores), como cofactor de unas 32.000 proteínas en el organismo, activación y regulación actuando como vía de señalización y proliferación celular, migración y reparación de tejidos, influenciados por los dominios de los dedos de **Zn** (**Vallée et al., 1991; Brzóska y Moniuszko-Jakoniuk, 2001; Cámara y Amaro, 2003; Pallauf y Müller, 2006; Formigari y Irato, 2007**). El **Zn** en el **ADN**, actúa como parte de los llamados “dedos de **Zn**” los cuales son estructuras que requieren de la presencia de este ion para llevar a cabo su actividad de unión en el **ADN**. Los “**dedos de Zn**” que actúan en los factores de transcripción están formados por una secuencia corta de aminoácidos (25 aprox.) que contiene dos moléculas de cisteína (**Cys**) y dos de Histidina (**Hys**), por medio de los cuales se unen a un átomo de **Zn** “*estructura más abundante en el genoma*” (**Ilustración 3**). Dependiendo de las repeticiones de esta secuencia corta de aminoácidos se determinará el número de dedos de **Zn** formados. Estas estructuras son fundamentales para fortalecer la estructura de la cromatina formando un bucle en la cadena polipeptídica mediante la creación de un puente entre los residuos de **Cys** e **Hys** y con ello, dar estabilidad a la estructura del **ADN** (**Semrad, 1999**;



Auld, 2001; Maret, 2001; Björndahl y Kvist, 2011) además de incluir el reconocimiento del ARN (Kimura y Aoki, 2001; Yamasaki *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2008).

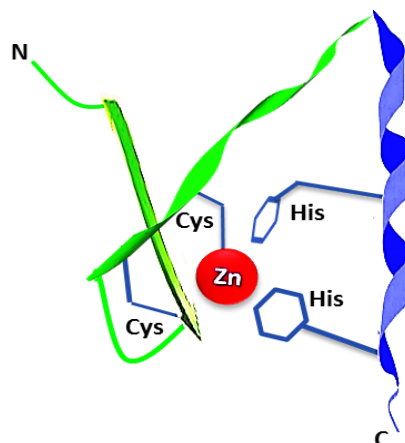


Ilustración 3. Dedos de Zinc.

2.4.2. Regulación de la Apoptosis

El **Zn** participa en la activación y regulación de la apoptosis celular, debido a que actúa sobre la regulación del crecimiento y proliferación de células normales y malignas. Puede ser considerado antiteratogénico, ya que interfiere con las vías de señalización implicadas en la apoptosis. Se ha descrito que el **Zn** induce la apoptosis celular (células epiteliales de la próstata, células gliales, neuronas, células epiteliales del ovario, coriocarcinomas, entre otras). Sin embargo, en otras células tiene una función anti-apoptótica (células epiteliales del pulmón, células renales, macrófagos, linfocitos, timocitos, células pancreáticas). Una concentración baja de **Zn** puede inducir a la apoptosis, mientras que concentraciones elevadas la inhiben. Esto dependerá de la capacidad de captación de **Zn** por parte de las células, los mecanismos celulares y la acumulación del mineral en ellas. El efecto protector del **Zn** se atribuye a la inhibición de las endonucleasas dependientes de **Ca** y **Mg**, desencadenantes de las últimas fases de la apoptosis. Se ha descrito, que parte de los mecanismos implicados en el efecto protector del **Zn** parecen ser a través de la inhibición de la vía de las caspasas (**caspasa-3**). Los iones de **Zn**, pueden inhibir a las proteasas que catalizan la conversión de los precursores de la caspasa-3 activa e inducir a la apoptosis de las proteasas. Con lo que, los efectos apoptóticos del **Zn** podrían servir para desarrollar agentes anti-tumorales (Hennig *et al.*, 1999; Formigari y Irato, 2007; Jackson *et al.*, 2008; Franklin y Costello, 2009).

2.4.3. Regulación Enzimática

El Zn actúa como componente esencial en una gran cantidad de reacciones enzimáticas, ya que interviene como cofactor del metabolismo enzimático (300 metaloenzimas), por lo que es el mineral que más enzimas activa, estando presente en las seis clases (**Maret, 2001; Hellman y Carlson, 2003; Favier y Hininger-Favier, 2005; Molokwu y Li, 2006; Formigari y Irato, 2007; Murakami e Hirano, 2008**). Las metaloenzimas que intervienen en los procesos de catálisis enzimática, desempeñan un papel estructural en las células, participan en variedad de procesos metabólicos como la síntesis y/o degradación de los lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos (**Ilustración 4**) (**Brandiio-neto et al., 1995; Mateos et al., 1998; Hedemann et al., 2006; Molokwu y Li, 2006; Formigari y Irato, 2007**).

Un ejemplo de éstas es la enzima de conversión de angiotensina (**ECA**), que está asociada con el desarrollo testicular y la espermatogénesis. Algunas investigaciones señalan un efecto directo sobre las células de Leydig y de Sertoli (**Bedwal y Bahuguna, 1994**). La fosfatasa alcalina, metaloenzima cuya función es hidrolizar los enlaces éster fosfórico, entre un grupo fosfato y un radical orgánico en un pH básico, liberando fosforo inorgánico, además de estar relacionada con la síntesis de **ADN**, estimula el crecimiento celular. A través de este mecanismo permite al espermatozoide mantener el equilibrio hídrico y un pH constante, la disminución de esta enzima se relaciona con la pérdida de tejido testicular y baja producción espermática (**Aonuma et al., 1978; Brandiio-neto et al., 1995; Molokwu y Li, 2006**).

Debido a que el **Zn** es un componente esencial de muchas enzimas de especial importancia para el crecimiento y la fertilidad masculina, no es de extrañar que las deficiencias nutricionales de **Zn**, a menudo se reflejen en un retraso de la velocidad y funcionalidad de los sistemas fisiológicos que son controlados por sistemas de enzimas dependientes de **Zn** como la **ADN** y **ARN** polimerasa, anhidrasa carbónica, carboxipeptidasa, fosfatasa alcalina, enzima de conversión de angiotensina, superóxido dismutasa, lactato deshidrogenasa, entre otras (**Brandiio-neto et al., 1995; Maret, 2001; Arthington et al., 2002; Johnson et al., 2011; Piotrowska et al., 2011**).

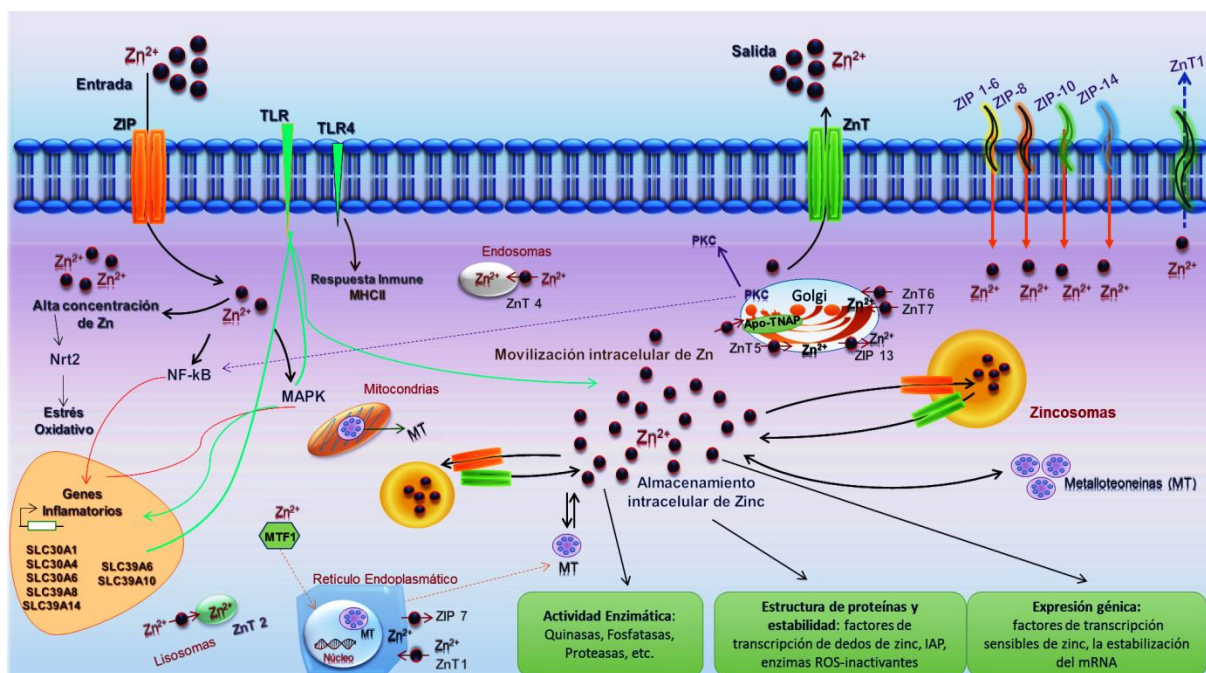


Ilustración 4. Diagrama sobre las funciones biológicas de Zn.

El Zinc como nutriente esencial es requerido para el crecimiento y diferenciación celular. El **Zn** puede afectar la actividad de varias moléculas de señalización, sin embargo aún se desconoce si este mineral podría actuar como una molécula intracelular de señalización, es decir como una molécula cuyo estado se altera en respuesta a un estímulo extracelular, y que es capaz de transportar el estímulo extracelular en un evento de señalización intracelular. No obstante, existen las teorías de su participación como molécula intracelular en dos tipos de señalización, una “señalización tardía de **Zn**”, en la cual la molécula es dependiente de un cambio en el perfil de expresión de los transportadores de **Zn** (**ZNTs**: **ZnT1**, **ZnT2**, **ZnT4**, **ZnT5**, **ZnT6**, **ZnT7**), donde se encuentran algunas familias de genes como los **SLC** donde los **SLC30** forman parte de los **ZnTs** y los **SLC39** conocidos como parte de la familia de los **Zip**, los cuales participan en la respuesta inflamatoria. La segunda teoría habla sobre una “señalización temprana de **Zn**”, lo cual implica una “onda de **Zn**” la cual es inducida directamente por un estímulo extracelular. Por otra parte está la participación del gen regulador de los factores de transcripción 1 (**MTF1**) los cuales actúan en la regulación de los genes antes mencionados, mismos que se encuentran en los dominios de unión de los “dedos de **Zn**” presentes en el **ADN**. Receptores tipo Toll (**TLR**), con una distribución tisular muy amplia considerados como receptores de señales de peligro tanto exógenas como endógenas implicadas en la respuesta inmune. Las **TLR4** promueve la rápida acumulación de **Zn** libre, además de modular la expresión de muchos genes transportadores de **Zn**. El factor de transcripción **Nrf2** actúan como protección contra el estrés oxidativo. Existe una movilización constante intra y extracelular de **Zn**, la cual se representa con la presencia de los **ZIP1**, **ZIP2**, **ZIP3**, **ZIP4**, **ZIP5**, **ZIP6**, **ZIP8**, **ZIP10**, **ZIP13**, **ZIP14** y las Metaloteneinas (**MTs**), participando en procesos de apoptosis celular. Modificado y adaptado de Hirano *et al.*, 2008; Kolenko *et al.*, 2013; Stafford *et al.*, 2013; Kambe *et al.*, 2015.

2.4.4. Factor Antioxidante

Las propiedades del **Zn** como factor antioxidante en los sistemas biológicos juegan un papel importante, ya que participa en la estabilización de las membranas lipídicas, regeneración de células dañadas, como mecanismo de defensa antioxidante y puede bloquear la muerte celular (apoptosis). Este metal no sufre reacciones de óxido-reducción, lo que le confiere una capacidad de estabilidad importante, actuando como antagonista de metales redox-activos como el **Cu** y **Fe**. Está involucrando en procesos de transferencia de electrones en condiciones celulares normales y patológicas, pero debido a su carga eléctrica como hemos mencionado anteriormente, no puede cruzar las membranas biológicas por mecanismos de difusión pasiva. Estabiliza ciertos sulfhídricos de las enzimas oxidativas, un ejemplo de ello es su acción en la enzima tubulina (**Hortin et al., 1993; McMahon y Cousins, 1998; Hennig et al., 1999; Powell, 2000; Favier y Hininger-Favier, 2005; Özaslan et al., 2005; Ebert y Altman, 2008; Jackson et al., 2008; Björndahl y Kvist, 2011; Johnson et al., 2011; Piotrowska et al., 2011**).

Formigari e Irato (2007), señalan que el papel del **Zn** en la estabilización de las membranas lipídicas y en el bloqueo de la muerte celular, puede presentarse debido a que el **Zn**:

- ❖ Mantiene un nivel adecuado de **MTs**, que actúan como mecanismos de eliminación de radicales libres.
- ❖ Participa como componente esencial de la interacción con la enzima **Cu-Zn-SOD** (superóxido dismutasa).
- ❖ Protege a la célula de la acción de agentes tóxicos y otros grupos químicos nocivos.

Después de un estímulo nocivo, por ejemplo una inflamación transitoria, el posterior estrés de oxidación, induce la liberación de **Zn** procedente de **MT** a través de óxido nítrico (**NO**), promoviendo la actividad y expresión de enzimas antioxidantes, incluyendo **MT**, reduciéndose el daño oxidativo y las consecuencias de un estímulo de efectos perjudiciales para la célula, por lo que se ha demostrado que el **Zn** puede actuar como modulador de la presencia de especies reactivas de oxígeno (**ROS**) (**Formigari e Irato, 2007; Lattanzio et al., 2008; Johnson et al., 2011; Piotrowska et al., 2011**).

2.4.5. Sistema Gastrointestinal.

Desde el punto de vista de la fisiología del tracto gastrointestinal, el principal sitio de absorción de minerales es el intestino delgado, por lo que el **Zn** está relacionado con el desarrollo de las vellosidades, mejorando la integridad de la mucosa y favoreciendo la capacidad de absorción del mineral en el intestino. Esto, proporciona mayor disponibilidad de nutrientes para el animal, mediante mecanismos similares a los de los antibióticos, actuando como promotores de crecimiento. Por lo que el **Zn** puede actuar como aditivo aumentando la estabilidad de la microbiota intestinal. Al ser más estable esta microbiota, la pared intestinal se vuelve más delgada y con ello favorece la absorción de nutrientes, además de activar el sistema inmune. Todos estos mecanismos están regulados por las **MTs** (Veum *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2011; Tran *et al.*, 2011).

2.4.6. Sistema Inmunológico

El **Zn** es un oligoelemento esencial para el sistema inmunológico, porque participa en el desarrollo y maduración del sistema linfático, siendo esencial para la función inmune y humoral de cerdos en crecimiento, ya que mejora la acción de los macrófagos cuando se adiciona dicho mineral en el pienso. El aumento o disminución de **Zn** trae como resultado una alteración en la respuesta inmune.

Existen evidencias de que un aumento en la proliferación de linfocitos, estimula la acción de la timulina y la función de los fagocitos ya que, cada sistema de células altamente proliferantes depende de la disponibilidad suficiente de **Zn**. Una deficiencia, provoca la atrofia de la glándula del timo, afectando el sistema de defensa antioxidante y se ha asociado a un aumento en la morbilidad y mortalidad de lechones. Miller *et al.* (1968), afirman que lechones alimentados con piensos que contenían 100 ppm de **Zn** al ser sacrificados, el timo tenía un peso de 51 gr, mientras que cerdos alimentados con piensos que contenían 12 ppm de **Zn**, el timo solamente pesaba 2 gr. Una ingesta inadecuada de **Zn** en animales jóvenes los deja inmunodeprimidos y susceptibles a microorganismos, parásitos, virus y/o bacterias. Por lo que los requerimientos de **Zn** para optimizar ciertos aspectos del sistema inmunológico en cerdos pueden ser mayores que los necesarios para el desarrollo normal del organismo. Por ello, los suplementos de **Zn** deben ser supervisados con precisión (Shankar y Prasad, 1998; Rink y Gabriel, 2001; van Heugten *et al.*, 2003; Hirano *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2011).

2.4.7. Función en el Crecimiento

El **Zn** ha sido mencionado como un regulador de la proliferación y crecimiento celular. La hipófisis contiene una gran concentración de **Zn** encargado de controlar la función hormonal, y con ello, la secreción de la hormona del crecimiento (**GH**). Esta hormona, cuenta con un sitio de unión a **Zn** que es estructural y funcionalmente importante para regular el crecimiento somático. La hormona de crecimiento, estimula la síntesis hepática y la secreción de **IGF-I** a través de la asociación con los receptores de **GH** en el hígado. La síntesis del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (**IGF-1**), también es regulada por la presencia de este mineral. La relación entre el estado de **Zn** y de **IGF-I** se cree que interviene en el efecto promotor del crecimiento de la **GH**. Los efectos anabólicos de **IGF-I** en las células osteoblásticas son mediados y mejorado por la presencia del **Zn** en el organismo (MacDonald, 2000; Turgut *et al.*, 2005).

2.4.8. Función en la Reproducción

El **Zn** está involucrado en las funciones reproductivas, desempeñando un papel importante en la fertilidad masculina ya que es vital para la activación de las enzimas que participan en la esteroidogénesis (producción hormonal), estimulando la activación de la 5- α -reductasa, el mecanismo de acción de la testosterona, desarrollo testicular, producción de células germinales y con ello, la estimulación de la espermatogénesis y el comportamiento sexual. Las necesidades de este mineral en los tejidos reproductivos están influenciadas por el estado fisiológico de dichos tejidos durante el ciclo reproductivo (Hahn y Baker, 1993; Tuormaa, 1995; Cupic *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1999; Arthington *et al.*, 2002; Favier y Hininger-Favier, 2005).

2.4.8.1. Producción Hormonal

La función normal del eje hipotálamo-hipófisis para la producción hormonal adecuada y por tanto la aparición de la pubertad, está regulada por mecanismos dependientes de **Zn**, este ión es necesario para estimular la actividad de la 5- α reductasa e dihidrotestosterona (**DHT**), mediadores importantes del comportamiento reproductivo influyendo en el crecimiento prostático, testicular, y en la producción de espermatozoides (Robinson 1990; Favier, 1992; Cámara y Amaro, 2003; Henkel *et al.*, 2003; Favier y Hininger-Favier, 2005; Romero *et al.*, 2001). El **Zn** participa en la producción y secreción de testosterona por las células de Leydig, que en conjunto con la **FSH** regulan la espermatogénesis, además de conferirle estabilidad a la cromatina espermática

(**Croxford et al., 2011; García-Contreras et al., 2011**). Por otra parte, la capacidad que tienen las células de Sertoli para funcionar eficazmente está relacionada con la concentración de hormonas con las que se retroalimenta. Por ello, cuando existe una deficiencia de **Zn** y se reduce la actividad de la 5 α -reductasa, se observa que la **DHT** disminuye la producción de testosterona, reduciéndose también la espermatogénesis. Estas deficiencias, también son asociadas a una reducción de la función de los receptores de **LH** en las células, ocasionando con ello una disminución en la síntesis de esteroides y un daño oxidativo en las células de Leydig (**Hidiroglou y Knipfel, 1984; Bedwal y Bahuguna, 1994; Leake et al., 1984, citado por Henkel et al., 2003; Croxford et al., 2011**).

2.4.8.2. El Zn en los Testículos

La importancia del **Zn** en el parénquima testicular se ve reflejada directamente en los conductos seminíferos, debido a que este mineral, contribuye al desarrollo y densidad de los túbulos seminíferos, además de participar en el crecimiento testicular (**Evenson et al., 1993; Bedwal y Bahuguna, 1994; Mahan et al., 2002; Piotrowska et al., 2011**). La espermatogénesis, depende del número de células de Sertoli que se desarrollan en el testículo, por lo que, una mayor cantidad de dichas células por gramo de testículo aumentaría el número de células germinales (**NRC 1998; Lleó, 2000; Strzezek et al., 2000; Marchesi, 2004; França et al., 2005**).

La concentración de **Zn** en los machos parece estar influenciada por la actividad sexual de los mismos, por lo que el contenido de este mineral en el parénquima testicular es mayor en animales adultos que en prepúberes (**Bedwal y Bahuguna, 1994**). Un bajo consumo de **Zn** en machos jóvenes interfiere en el normal desarrollo sexual, se presentan lesiones en testículo, atrofia de túbulos seminíferos, malformaciones en la célula espermática que afecta al axonema viéndose alterada la motilidad (**Tuormaa, 1995**). Los niveles de **Zn** en el pienso entre 23 **ppm** hasta 100 **ppm**, no afectan las características de desarrollo e integridad del parénquima testicular, la libido y la producción espermática (**Louis et al., 1994b; Mateos et al., 1997**). Aunque, algunos investigadores como **Riopérez (1991), Close y Roberts (1991) y Close (1993a, b)**, recomiendan que los cerdos consuman al menos un 20% más de **Zn**, llegando a concentraciones de 120 o 150 **ppm** de **Zn** en el pienso. Con toda esta información, se puede deducir que utilizando un pienso que contenga entre 70 a 150 **ppm**, no deben

existir problemas en el estado físico, producción y calidad seminal del verraco (**Close, 1998**).

Bajo condiciones de estrés térmico (elevación de temperatura), se ha demostrado que un aumento de los niveles de **Zn** en el pienso, incrementa la libido y la concentración espermática tres a cuatro veces. En dichos piensos debe aumentarse la concentración de **Ca**, ya que es posible la formación de quelatos entre **Zn** y **Ca** con ello, una disminución en la biodisponibilidad de ambos minerales (**Quiles y Hevia-Méndez, 2002**).

2.4.8.3. Efecto del Zn en Epidídimo y Espermatozoides

El epidídimo secreta y absorbe proteínas a través de las células principales, realizando endocitosis, y secretando al lumen un medio ácido. Además, tienen un mecanismo de defensa provisto de células basales con mecanismos de fagocitosis y antioxidación (**França et al., 2005**). En el epidídimo, el espermatozoide cambia las proteínas y lípidos de la membrana plasmática, gracias a las secreciones del epitelio epididimal, expulsa la gota citoplásmica (**GC**) y cambia el patrón de movimiento, el cual desde su salida del testículo es débil o nulo (**Ardón, 2005; França et al., 2005; Sansegundo, 2008**). Estos cambios en los espermatozoides, se realizan durante el tránsito por la cabeza y cuerpo del epidídimo, para posteriormente ser almacenados en la cola del epidídimo, donde se mantienen inmóviles, pero con un movimiento potencial rectilíneo que será presentado en el momento de la eyaculación.

Henkel et al., (2003), descubrieron que existían dos proteínas en el epidídimo que se unen al **Zn**, señalando que su concentración es cinco veces más grande en la cabeza que en la cola del epidídimo, mencionando que estas proteínas tienen una función biológica importante de movilización de este **Zn** expulsado de la cola del espermatozoide. Además, demostraron que el **Zn** presente en las células basales de epidídimo pertenece al espermatozoide. Existe por lo tanto una evidencia para explicar que si el epidídimo no produce estas proteínas o sus mecanismos de excreción-absorción, el **Zn** podría acumularse y producir la pérdida de la homeóstasis del ion. El espermatozoide puede eliminar **Zn** por las secreciones epididimales o en su defecto, se libera un mecanismo de bloqueo para la expulsión del **Zn** por parte del espermatozoide. También observaron que el **Zn** puede reabsorberse en pequeñas cantidades incluso en la cola del epidídimo.

Este micromineral está relacionado con la formación de la cromatina a través de las metaloenzimas; mediante la integración de los dedos de **Zn**, por lo que la estabilidad de la cromatina espermática es dependiente de este mineral. Forma parte de estructuras celulares como las fibras densas externas (**FDE**) del espermatozoide y se une a proteínas

que permiten la estimulación de genes de transcripción (**Maret, 2001; Henkel et al., 2003; Jackson et al., 2008; Björndahl y Kvist, 2011; Piotrowska et al., 2011**).

La cola del espermatozoide contiene más del 93% del **Zn** total del mismo, localizado especialmente en las **FDE** del espermatozoide. Estas **FDE**, se extienden a lo largo del 60% de la longitud de la pieza principal de la cola del espermatozoide y están constituidas de proteínas estructurales que contienen una gran cantidad de **Cys**. En el testículo, el **Zn** se une al grupo **-SH** de la **Cys** y forman el complejo **Zn-tiol**, para evitar la oxidación de las **FDE**. Durante la maduración en epidídimo, el 60% del contenido mineral es expulsado y a continuación el grupo **-SH** es oxidado para formar puentes disulfuro (**S-S**), estabilizando y endureciendo las **FDE**. El contenido de **Zn** en la cabeza corresponde al 7% del contenido total. Este **Zn** se encuentra en el **ADN** aportándole estabilidad a la cromatina. Con lo que el contenido de **Zn** es cuatro veces mayor en el espermatozoide que en el plasma seminal (**Evenson et al., 1993; Bedwal y Bahuguna, 1994; Kvist et al., 1987, citado por Henkel et al., 2003; Dolan, 2004**). En los procesos de meiosis y espermiogénesis, el **Zn** impide daños en la célula, dándoles protección y apoyando la síntesis de **ADN** espermático. Durante la espermiogénesis las histonas son reemplazadas por proteínas de transición y finalmente por protaminas (**Evenson et al., 1999; Evenson, 2005; Ardón, 2005; Molokwu y Li, 2006; Piotrowska et al., 2011**).

2.4.8.4. Efecto del Zn en Glándula Prostática y Plasma Seminal

La concentración de **Zn** en la glándula prostática es elevada cuando se suministra **Zn** en las cantidades recomendadas y esto favorece la concentración que se observa en el plasma seminal (**Iguchi et al., 2004**). El almacenamiento de **Zn** en la próstata, favorece la acumulación de este mineral en los espermatozoides cuando estos, se mezclan con las secreciones de la próstata durante la eyaculación (**Evenson et al., 1993**). Esta mezcla otorga a las células su capacidad de movimiento. En el plasma seminal, el contenido de **Zn** oscila entre 2.06mM en humanos, 349µM en cerdos, 1.04mM en perros y 600µM en conejos (**Aonuma et al., 1978**).

2.5. Deficiencias de Zn

Un gran número de funciones y sistemas se ven afectados por la presencia u ausencia de **Zn**, por lo que una buena organización y coordinación de procesos

biológicos es necesaria para que el animal asegure su supervivencia cuando la presencia y la ingesta de este mineral es insuficiente.

La disponibilidad limitada del mineral en el organismo originada por un bajo consumo, es rápidamente detectada a nivel celular y con ello, puede perjudicar la capacidad de respuesta del organismo y conducirlo a un estado de deficiencia (**McDonald, 2000; Maret, 2001**). El estudio de estas deficiencias en los organismos, establece la importancia del **Zn** en el desarrollo y crecimiento. La primera manifestación de deficiencia en los animales es la anorexia, que está acompañada por la disminución del apetito y de la eficiencia alimenticia, relacionándose con los procesos de crecimiento y su participación en la expresión de genes, así como alteración y disminución de la actividad enzimática (**Revy et al., 2006; Johnson et al., 2011; Tran et al., 2011**). Los signos clásicos de deficiencias en cerdos se manifiestan con la presencia de hiperqueratinización de la piel (paraqueratosis), reducción en la velocidad y eficiencia de crecimiento. En cerdas en periodo de lactancia, disminuye la concentración de **Zn** en la leche, mientras que en otros pueden presentarse manchas o decoloración del pelaje, disminución del tamaño y peso de la camada. En lechones se presentan diarreas, vómito, y en casos de deficiencias severas puede producirse la muerte de los animales (**Mateos et al., 1998; NRC, 1998; Samuelson et al., 1999; Molokwu y Li, 2006; Johnson et al., 2011; Tran et al., 2011**).

A nivel del sistema gastrointestinal, se ha demostrado que las deficiencias de este mineral causan atrofia de las vellosidades del intestino, un elevado número de células apoptóticas en la mucosa, presencia de ulceraciones, inflamación así como disminución de la proliferación de las criptas. Se ha indicado que la digestión de carbohidratos (reducción de la actividad de las disacaridasas) se ve afectada contribuyendo con ello a una mala nutrición (**Tran et al., 2011**).

Los niveles de **IGF-I**, son fácilmente alterados por una disminución de los niveles séricos de **Zn**, y con ello se ve afectado el crecimiento y la captación de la enzima timidina, la cual está regulada por la disponibilidad de **Zn** en la célula. Un estudio en ratas con deficiencias de **Zn** sugiere que al haber una disminución de este mineral en el organismo la absorción de **Ca** en las plaquetas y sinaptosomas se ve afectada. Se cree que el **Zn** tiene un papel regulador en la mitogénica de la transducción de señales dependientes de **Ca** (**O'Dell y Emery, 1991; Browning y O'Dell, 1994; MacDonald, 2000**).

Los machos en periodo de crecimiento pueden sufrir alteraciones en el crecimiento normal de los testículos, glándula del timo y con ello disminuye su desarrollo normal. En verracos jóvenes provoca retraso en el desarrollo de las células de Leydig y una reducción en la respuesta de la **LH**, y en la esteroidogénesis testicular (**Hesketh, 1982; Mateos et al., 1998; NRC, 1998; Samuelson et al., 1999; Molokwu y Li, 2006; Johnson et al., 2011; Tran et al., 2011**).

Iguchi et al. (2004), señalan la relación que tiene una deficiencia de **Zn** con el hipogonadismo, acompañada de la inhibición de la espermatocitogénesis por disminución de testosterona (**Bedwal y Bahuguna, 1994**). El mecanismo que puede provocar el hipogonadismo y reducción en el desarrollo de los túbulos seminíferos, estaría relacionado con la inhibición de la división celular durante la mitosis ocasionada por la deficiencia de **Zn** (**Murakami e Hirano, 2008**). En los túbulos seminíferos el daño es irreversible, provocando esterilidad (**Evenson et al., 1993; Bedwal y Bahuguna, 1994**). **García-Contreras et al. (2010)**, señalan que hay un aumento en las anomalías espermáticas cuando se presentan deficiencias de este mineral, por lo que hay un creciente interés en comprender la relación entre los niveles y las fuentes de **Zn** utilizados en los piensos de verracos y su efecto sobre la fertilidad. Estas deficiencias, también pueden estar relacionadas con la interacción entre minerales, ya que otros iones pueden competir por los sitios de unión de **Zn** en las proteínas transportadoras y con ello ser desechado del organismo sin ser asimilado.

2.6. Toxicidad de Zn

Los minerales son considerados elementos esenciales para el animal, puesto que intervienen en diversos procesos primarios del organismo, no obstante después de una exposición excesiva a estos elementos puede producirse efectos tóxicos. Existen metales pesados esenciales para una función testicular normal, como son el **Zn, Cu, Mn y Se**. Sin embargo, algunos tienen efectos tóxicos, como el Plomo (**Pb**), Cadmio (**Cd**), Mercurio (**Hg**) y Cobalto (**Co**) (**Bedwal y Bahuguna, 1994; Stohs y Bagchi, 1995; Rafique et al., 2009**).

El **Zn** también puede considerarse potencialmente tóxico por lo que debe mantenerse bajo estricto control celular y almacenado en el sitio exacto. Algunos mecanismos de toxicidad por parte del **Zn** están relacionados con la sustitución de este ión, por otros cationes en enzimas no dependientes, provocando su inactivación. El **Zn** a nivel mitocondrial inhibe los sitios de unión con otros minerales (**Regalla y Lyons, 2005**).

Algunos investigadores señalan que no existe riesgo para los cerdos cuando consumen dosis de **Zn** en hasta 200mg/Kg^{-1} en el pienso. Sin embargo, con niveles de 2000mg/Kg^{-1} , los cerdos manifiestan depresión, disminución del crecimiento, problemas gastrointestinales, artritis, hemorragias en los espacios axilares y descamación de la piel (Pallauf y Müller, 2006).

Según Szabo *et al.* (2004) los cerdos tienen una alta tolerancia a consumos excesivos de **Zn**. A pesar de ello, se ha observado que dependiendo de la fuente con la que se realice este exceso, se puede presentar con mayor facilidad una toxicidad. Un ejemplo de esto es el uso farmacológico de **ZnO** a niveles de 3000ppm , donde los cerdos no presentaron signos de intoxicación (Hedemann *et al.*, 2006), aunque cerdos que consumen **Zn** ($>200\text{ppm}$), suelen incrementar la concentración de este mineral en hígado, riñón y páncreas, pero en piel, hueso y músculo no se observa un aumento significativo (Rojas *et al.*, 1995; Schiavon *et al.*, 2000; Hedemann *et al.*, 2006). El consumo de **Zn** a niveles de 2500ppm , incrementa la actividad de las enzimas pancreáticas (Hedemann *et al.*, 2006). Los resultados de otro estudio señalan que la adición de 2500mg/Kg^{-1} de **Zn** en el pienso de cerdos en crecimiento mejora la ganancia de peso de los animales, en comparación con los que fueron alimentados con 200 y 500mg/Kg^{-1} de **Zn** en el pienso (Davis *et al.*, 2004).

Una dieta con alto contenido de **Ca**, puede reducir la toxicidad del **Zn**, pero si este es suministrado por periodos prolongados en cerdas multíparas, se presentan problemas de osteocondrosis, camadas pequeñas y bajos pesos al destete. En el caso de lechones provenientes de cerdas alimentadas con altas concentraciones de **Zn**, reducen el contenido de **Cu** en los tejidos y si no se da un suplemento de **Cu** a los lechones presentan problemas de anemia. (NRC, 1998). Un tratamiento previo con minerales esenciales como el **Zn** puede prevenir la aparición de signos de toxicidad como son lesiones en los tejidos causadas por la presencia de metales tóxicos y la aparición de especies reactivas de oxígeno, las cuales provocan daño en el ADN (Bedwal y Bahuguna, 1994; Stohs and Bagchi, 1995; Rafique *et al.*, 2009).

García-Contreras *et al.* (2011), señalan que una concentración elevada de **Zn** suplementado en el pienso, puede dar como resultado efectos adversos sobre la calidad del ADN espermático, lo cual es probable que se relacione con la capacidad de las células espermáticas de acumular **Zn** durante la espermatogénesis. Por su parte, Evenson *et al.*, (1993), demostraron que un exceso de **Zn** (500mg/Kg^{-1}) en el pienso puede desestabilizar las uniones **S-S** y los complejos de **Zn-SH** dentro y entre las protaminas, llevando a la desnaturalización de la estructura cuaternaria de la cromatina y

presentando una mayor desestabilización del **ADN**. En verracos jóvenes en producción alimentados con un pienso suplementado con **Zn-Metionato 200ppm**, produjo daños significativos en el **ADN** de los espermatozoides durante el período de alimentación. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar si este efecto es reversible cuando se le suministra una dieta normal o si la exposición inicial a altos niveles de **Zn** en la dieta puede interferir con el desarrollo futuro de los espermatozoides (**García-Contreras et al., 2010**).

La disponibilidad intracelular de iones de **Zn** debe ser equilibrada en contra de su toxicidad potencial. El mantenimiento óptimo de los niveles de **Zn** requiere la integración de la expresión de enzimas con el mecanismo de transporte. La toxicidad dependerá de la fuente, nivel, duración del periodo de consumo, y la concentración de otros minerales en la dieta. Debemos tener presente que el **Zn** es un metal tóxico en altas concentraciones para el suelo y el medio ambiente. Por tanto, es considerado como un problema ambiental en zonas con una alta concentración de producción porcina, por lo que es importante considerar las limitantes legales para la utilización de fuentes y niveles de **Zn** adecuados para con ello optimizar la productividad y reducir la carga ambiental de este mineral (**NRC, 1998; NAP, 2005; Chivers, 2007; Schlegel et al., 2010**).

2.7. El Zn en la Alimentación de los Cerdos

El **Zn** está presente en el pienso pero debido a que los ingredientes utilizados en la formulación contienen cantidades variables del mineral, y en frecuentes casos estas cantidades son deficientes, por tanto se recurre a la suplementación mediante la formulación de correctores minerales (**Mateos et al., 1998; Cao et al., 2002; Jahanian et al., 2008**). Es importante conocer las necesidades en cada etapa fisiológica, edad, sexo, raza y peso de cada animal así como la disponibilidad de los micronutrientes, de las fuentes minerales, la concentración de fitatos, la presencia o no de otros cationes divalentes como el **Fe, Ca, Cu** (interacción); así como de la cantidad de proteína animal y el porcentaje de grasa que contenga el pienso (**Abdel-Mageed y Oehme, 1990^a; Fairweather-Tait y Hurrell, 1996; Acda y Chae, 2002; Pallauf y Müller, 2006**).

Pueden presentarse interacciones entre micronutrientes cuando altas dosis de un solo nutriente son suministradas o cuando la administración es inadecuada. Las interacciones entre **Fe, Zn y Cu** parecen ser importante. En los programas de suplementación mineral, es fundamental tener en cuenta los riesgos potenciales de las

interacciones entre minerales, especialmente cuando están dirigidos a animales con altos requerimientos de micronutrientes dependiendo de la fase productiva a la que están destinados.

Para identificar el valor nutritivo de cada ingrediente se recurre a los datos obtenidos por los centros de investigación especializados en la alimentación animal. Sin embargo, existen carencias importantes en algunos aspectos que se complementan utilizando diversas fuentes. Las más utilizadas son las tablas Holandesa (**CVB Veevoedertable**), Francesa (**INRA**), Británicas (**BSAS, Atlas Premier**), Americanas (**NRC, Tablas Brasileñas, NSNG**), y Española (**FEDNA**) (**de Blas et al., 2010**).

La técnica más aceptada para estimar las necesidades de minerales en cerdos es la utilización de modelos matemáticos. Desafortunadamente, no hay suficiente información científica para desarrollar un modelo preciso para la estimación de las necesidades de minerales que pondere todos los factores antes señalados. Por ello, organismos como el **NRC (1998)** y **FEDNA (2006)**, recomiendan la inclusión de niveles minerales, obtenidos de estudios relacionados con el comportamiento productivo, los cuales, no siempre consideran variables reproductivas.

Los cereales utilizados en la alimentación animal tienen una concentración de **Zn** de 30 a 40mg/Kg⁻¹ de materia seca, pero esta varía según la fracción del mismo. Esta variación es debida a que la distribución de **Zn** en los granos no es homogénea. La parte externa del cereal suele tener mayor contenido de **Zn** que la interna (60-90mg/Kg⁻¹ de materia seca). Por otra parte, las fuentes de proteína de origen animal como la harina de carne, harina de carne y hueso, harina de pescado, aportan una cantidad importante de **Zn** (80-120mg/Kg⁻¹ de materia seca) pero también tiene altas concentraciones de otros minerales como Ca, que compite con **Zn**, reduciendo la absorción de este último (**Underwood y Suttle, 1999; Mateos et al., 2005**).

En los piensos que utilizan ingredientes de origen animal puede observarse un aumento de biodisponibilidad de Zn (100%). Sin embargo, el **Zn** puede ser limitado por el contenido de fitatos, **Ca** y/o **P**. Por ello, se recomienda utilizar una fuente externa de **Zn** en el pienso, dependiendo de la edad y estado fisiológico del animal (**Hortin et al., 1993; Spers, 1996**).

Otras fuentes de proteína utilizadas para la formulación de piensos son las harinas de soja, sésamo, algodón y cacahuete que tienen concentraciones más pobres de **Zn** (50 a 70mg/Kg⁻¹ de materia seca) que las de origen animal. El **Zn** procedente de proteínas

vegetales y otros suplementos de la misma naturaleza son de baja disponibilidad para los cerdos. La razón es que estos ingredientes son ricos en ácido fítico el cual, al combinarse con el **Zn** forma complejos llamados fitatos de **Zn**. Dichos complejos son insolubles en el tracto gastrointestinal de los cerdos, limitando la biodisponibilidad y absorción de este mineral. Por lo tanto, el **Zn** presente en los concentrados de proteína vegetal es más escaso que en los suplementos de origen animal (**Mateos et al., 1998; Acda y Chae, 2002; Revy et al., 2006; Nitrayova et al., 2012**).

Las fitasas por hidrólisis de los complejos, puede proporcionar un medio importante para mejorar la biodisponibilidad del **Zn** y de igual forma, limitar la excreción del mineral vía heces, orina y/o fluidos corporales (**Revy et al., 2006**).

En la actualidad existen fuentes minerales inorgánicas y orgánicas utilizadas de forma indistinta en la elaboración de los piensos. Durante la última década, se ha dado más impulso a las fuentes orgánicas por su mayor biodisponibilidad y bajo impacto ambiental. No obstante, hay poca información que refleje el efecto de estas fuentes en el crecimiento, desarrollo, y actividad reproductiva de machos destinados a ser futuros sementales. Sin embargo, el resultado de algunas investigaciones, indican que los minerales quelatados, son más biodisponibles que las formas inorgánicas (**Spears, 1996; Hostetler et al., 2003; Creech et al., 2004; AAFCO, 2005; Cheng et al., 2005**).

Biodisponibilidad, según lo definido por **Levander (1983)**, es una medida cuantitativa de la utilización de un nutriente en un alimento, comida o en la dieta bajo condiciones específicas de apoyo a los procesos normales estructurales y fisiológicos que ocurren en el organismo. Es decir, describe las propiedades no sólo de absorción, y/o transporte a su lugar de acción, sino también la utilización de los nutrientes para una función específica (**Swinkels et al., 1994; Cao et al., 1996; Sandoval et al., 1997; Hostetler et al., 2003; Huang et al., 2009**).

Experimentos de dosis-respuesta son los que se utilizan para determinar el nivel óptimo de **Zn** recomendado con lo cual, el efecto de la dosis suministrada puede ser monitorizado a través del tiempo, considerándolo como un indicativo de la disponibilidad del mineral en las dietas experimentales. Una consideración importante en los estudios de biodisponibilidad es la fuente mineral utilizada influyendo en la respuesta obtenida (**Swinkels et al., 1994**).

Edwards y Baker (1999), señalan que la mejor manera de elegir una fuente de **Zn**, está en el coste por unidad biodisponible del mineral. Desafortunadamente existe poca información al respecto. Las publicaciones utilizadas en la industria de la alimentación porcina y en el ámbito académico difieren en las cantidades óptimas para el desarrollo adecuado de las funciones corporales por etapa productiva.

De forma general, se sabe que los quelatos son más biodisponibles que los sulfatos, los sulfatos más que los carbonatos y estos últimos más que los óxidos, pero esta clasificación no siempre es real (**de Blas et al., 2010**). Investigaciones realizadas con cerdos en crecimiento, señalan que la biodisponibilidad del **Zn** resultó más baja utilizando **ZnO** e intermedia para **Zn-Lisina** y **Zn-metionina** cuando se compararon con **Sulfato de Zn** (**Schell y Kornegay, 1996**). No obstante, **Wedekind et al. (1990)**; **Wedekind et al. (1992)** y **Cao et al. (2000)** han encontrado que fuentes orgánicas, como el **Metionato** y **Propionato de Zn** tienen mayor biodisponibilidad que las fuentes inorgánicas, como el **ZnO** o **ZnSO₄H₂O**. Esta es la razón por la que las fuentes orgánicas de **Zn** se utilizan cada vez con mayor frecuencia en la industria alimenticia.

Por otra parte, existe una variación considerable entre los productos minerales disponibles en el mercado (Proteinatos, Quelatos, etc), algunos pueden ser eficaces en una especie en particular, mientras que otra no. Se requieren más estudios para definir el uso de minerales orgánicos en la alimentación orientados a mejorar y establecer los mecanismos de acción mediante los cuales se mejora el rendimiento de los animales (**Spears, 1996; Hostetler et al., 2003**). La repetitividad de comportamiento del mineral visto a través de varias especies animales, es la mejor forma de valorar la acción de dicho mineral (**Cheng et al., 2005**).

Mateos et al. (1998), señalan que las necesidades de **Zn** en el cerdo son altas en la mayoría de las etapas fisiológicas, y que se debe poner especial atención cuando la ración esté formulada con materias primas de origen vegetal, debido al alto contenido de fitatos, o con fuentes de **Zn** de baja biodisponibilidad, sin dejar de lado las posibles interacciones entre minerales, las cuales, disminuyen la absorción del **Zn** por parte del organismo (**Hernández, 2006**).

EI NRC (1998), cita que la administración de **Zn** en cerdos no castrados puede ser aumentado hasta el doble de lo recomendado para esa etapa productiva. Con ello, se garantiza un adecuado desarrollo testicular. Sin embargo, es evidente que un régimen nutricional que maximice una respuesta en una etapa del desarrollo, tenga efectos que pueden ser contraproducentes en etapas posteriores (**Robinson, 1990**).

Hay una amplia variación en los niveles de inclusión de **Zn** en los piensos para cerdos. **Höhler y Pallauf (1994)**, recomiendan para lechones 80mg/Kg^{-1} de **ZnSO₄** en piensos con base harina de maíz y soja. **Wedekind et al, (2004)**, recomiendan para cerdos en crecimiento y finalización, alimentados con un pienso en base a harina de maíz y soja suplementada con **ZnSO₄**, 50mg/Kg^{-1} .

El óxido de **Zn** (**ZnO**), es la fuente inorgánica que se utiliza normalmente para mejorar el rendimiento en el crecimiento de cerdos destetados y disminuir la incidencia de diarreas, administrado en concentraciones farmacológicas (**Hahn y Baker, 1993; Buff et al., 2005**). **Pérez et al.(2011)**, señalan que añadir 2000 y 3000mg/Kg^{-1} de **ZnO** en el pienso de cerdos destetados, es la fuente más eficaz para estimular el crecimiento. Algunos investigadores como **Holli et al.(2005)**, indican que utilizar concentraciones de **ZnO** menores a las farmacológicas, proporcionan resultados similares a los anteriormente mencionados. Además, se reduce considerablemente el impacto ambiental al utilizar las heces como fertilizantes.

Case y Carlson (2002), observaron que más del 99% del **Zn** es excretado en las heces, independientemente de la fuente (orgánica o inorgánica) o nivel de inclusión en la dieta (150, 500 o 3,000ppm de **Zn**). **Meyer et al.(2002)**, señalan que una alimentación a corto plazo con **Zn** en lechones, da como resultado una excreción igual a la de cerdos en crecimiento y finalización alimentados con 100 ppm de **Zn** (**Hollis et al., 2005**).

Hernández (2006), comparó los niveles de **Zn** recomendados en la elaboración de pienso para cerdos, encontrando diferencias hasta de un 30%, señalando que las normativas no consideran aspectos relacionados con el impacto ambiental, bienestar animal, eficiencia productiva, y/o sistemas de producción. Concluye que las normativas sólo representan un límite, un punto de partida para establecer márgenes de tolerancia, sin justificar realmente su efecto en las distintas etapas productivas y los diversos sistemas de producción existentes actualmente. Por lo que se debe poner especial atención a los ingredientes con los que son formulados los piensos.

2.7.1. Necesidades Nutricionales de Zn

La formulación de piensos para cerdos se ajusta a las normativas existentes, con el fin de lograr la eficiencia en términos de productividad, seguridad alimentaria, protección del ambiente y el bienestar de los animales. Las necesidades nutricionales de los cerdos varían en cada etapa productiva por lo que se deben tener en consideración a

la hora de formular las raciones. Sin embargo, no es suficiente la información existente sobre la composición y las necesidades de los animales por etapa. Particularmente, las necesidades de minerales son difíciles de establecer y la mayoría de las recomendaciones actuales se basan en niveles mínimos necesarios para prevenir síntomas de deficiencias y no necesariamente para promover la productividad y el bienestar del animal, sin considerar la cantidad (origen natural) disponible en los ingredientes de los piensos. Por tanto, la adición de minerales en los piensos difiere de las recomendaciones establecidas en las normativas de cada país (**BSAS, 2003; Close, 2003; Mullan et al., 2006; Mendoza et al., 2010**).

El conocimiento de las necesidades de nutrientes es esencial para reducir al mínimo los costes de producción y sobre todo permitir una expresión plena de la capacidad productiva de los animales. Es importante el aporte de minerales en el pienso para cerdos jóvenes en producción por lo que se precisa una estimación correcta de las necesidades diarias de **Zn** para un buen crecimiento, desarrollo y reproducción (**Carlson y Boren, 2001; Hostetler et al., 2003; Studziński et al., 2006; Kim y Lindemann, 2007**).

Cerca del 5% del peso corporal total del cerdo se compone de elementos minerales. Estos, son esenciales para el desarrollo del metabolismo básico de las proteínas, grasas e hidratos de carbono. Los requerimientos de minerales para animales jóvenes, que les proporcionen un desarrollo adecuado de las funciones corporales principalmente durante periodos de crecimiento intensivo, son indispensables, ya que dichas necesidades cambian durante el crecimiento y desarrollo del animal (**Carlson y Boren, 2001; Studziński et al., 2006**).

No obstante, las necesidades de **Zn** son un tema frecuente de debate. La adición de este nutriente en la dieta de cerdos a menudo es mayor que los niveles sugeridos por el **NRC, 1998**, debido en parte a que no se conocen en detalle las necesidades de minerales del ganado porcino de acuerdo con el genotipo del animal, tipo y etapa de producción (**van Heugten et al., 2003; FEDNA, 2006**).

La mayoría de las investigaciones para determinar las necesidades de minerales para el ganado se han realizado hace más de 40 años. Sin embargo, las necesidades de los sistemas de producción actuales han evolucionado y difieren con las características de la producción en que se desarrollaron estas investigaciones. Como consecuencia de ello, en la actualidad la adición de minerales en los piensos tiene una variación 3 a 4 veces superior a la recomendada. Por lo que se requiere, un conocimiento más exacto de las necesidades de nutrientes para mantener la salud, maximizar el rendimiento

productivo de los animales, reducir la contaminación ambiental y maximizar los beneficios de los productores. Se requieren nuevas evaluaciones y actualizaciones en el uso de algunos nutrientes en todas las etapas de producción. En el área reproductiva existen deficiencias en el empleo de nutrientes principalmente en verracos (**BSAS, 2003; Mullan et al., 2006; Kim y Lindemann, 2007**).

Las necesidades de **Zn** son superiores en cerdos enteros que en hembras y machos castrados, así como en cerdos sanos con buen crecimiento que para cerdos con problemas patológicos. En el caso de machos seleccionados como futuros reproductores no están bien determinados pero se considera que las necesidades de este mineral pueden ser mayores que para animales en crecimiento. Estos niveles utilizados en la fase de crecimiento se consideran de gran importancia para la vida reproductiva del animal. **Close y Cole, (2000)**, mencionan que las restricciones alimentarias en verracos, particularmente de minerales, producen un efecto drástico en ellos, debido a la disminución del consumo de nutrientes necesarios para su rendimiento óptimo. Por ello, una práctica normal es suministrar cantidades de **Zn** superiores a las recomendadas para cerdos de cebo y finalización, garantizando aparentemente un adecuado desarrollo hormonal, testicular y de las glándulas sexuales (**Liptrap et al., 1970; NRC, 1998; Official Journal of the European Union, 2003; Marchesi, 2005; FEDNA, 2006; FEDNA, 2013**).

La Comisión Reguladora de la Unión Europea (*Scientific Committee for Animal Nutrition*) expone restricciones en la inclusión de un contenido máximo de minerales autorizados en la alimentación porcina con el fin de adaptar estos niveles a las exigencias fisiológicas de los animales y para minimizarlos efectos negativos sobre el ambiente, las cuales se señalan en la normativa **No.1334/2003** del Official Journal of the European Union, 2003(**Mullan et al., 2006**).

Distintos organismos internacionales dedicados al estudio de las necesidades nutricionales en porcino sugieren diferentes niveles de suplementación de **Zn** en cada etapa productiva. En la **Tabla 2** se muestran algunos niveles actualmente permitidos y manejados en la industria de piensos.

En la práctica las tablas más utilizadas para la formulación de piensos en porcinos, son las publicadas por le **NRC (1998)**. Sin embargo, estudios realizados en cerdos en etapas tempranas, ofrecen resultados que demuestran efectos diferentes dependiendo de las fuentes y niveles de **Zn**. No obstante, en hembras reproductoras y en

verracos sigue habiendo una serie de interrogantes que con la información científica existente, aún no son del todo claras. Dentro de estas incógnitas están la importancia o repercusión que tiene la utilización de diferentes fuentes de **Zn** (fuentes orgánicas vs fuentes inorgánicas) y el nivel óptimo que requieren los verracos para una adecuada función reproductiva (**García, 2010**).

Las recomendaciones de minerales suelen tener un amplio margen de seguridad (70-150ppm), considerándolo suficiente para cubrir las necesidades de los animales (**Mahan et al., 2002; Wilson et al., 2002**), aunque se desconoce la influencia que tienen sobre la vida productiva del verraco.

Close (1998); señala que con 100mg/Kg⁻¹ de **Zn** en el alimento se mantiene una adecuada espermatogénesis. **Riopérez (1991)**; recomienda niveles de **Zn** en cerdos no castrados en etapa de crecimiento de 40 ppm. De forma práctica, los piensos de verracos entre 90-100Kg⁻¹ de peso vivo se suplementan con 100ppm de **Zn**. Sin embargo, las necesidades de Zn en estos verraco se ven incrementados en un 20% (**Riopérez, 1991; Close y Roberts, 1991; Close, 1993**), coincidiendo con las recomendaciones de **PIC (2006)** (120 ppm).

Debido a que existen diferencias en los niveles de suplementación de **Zn** para cerdos, **Revy et al.(2006)**, sugieren que se deberían actualizar las tablas de recomendaciones minerales para animales en crecimiento.

La nutrición en machos durante el periodo de crecimiento, afecta tanto al peso como al inicio de la pubertad. Por ello, se requieren más experimentos sobre los efectos de la nutrición en el rendimiento reproductivo de animales jóvenes durante los periodos de desarrollo y crecimiento hasta la edad reproductiva de un semental. Los verracos son

Tabla2. Necesidades Nutricionales de Zn en Cerdos no Castrados y Verracos

Autor	Requerimiento Zn (ppm)	Etapas de producción	Peso (Kg)
ARC, 1981	50	Todas	-
GfE, 1987	50-60 50	Todas Verracos*	20-120 >120
INRA, 1989	100	Todas	-
Feedstuffs, 1989	100	Verracos*	> 120
Close, 1993a	100	Verracos*	> 120
Wedekind et al., 1994	45-50	Crecimiento	> 25
SNGC, 1995	75	Crecimiento/Finalización	20-55
	50		55-100
	75		100-120
	100	Verracos*	> 120
NRC, 1998	60	Crecimiento	28-60
	50	Finalización	60-110
	100	Verracos*	> 120
Anonymous, 1999	60	Crecimiento/ Finalización	20-100
Rostagno, 2000	100	Crecimiento	20-60

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

SNG-UN&SD, 2000	70-150 60-150 50-150 50-150	Crecimiento/ Finalización	20-36 36-60 60-86 86-113
	80-150	Verracos*	> 120
Carlson y Boren, 2001	60 50 50	Crecimiento/ Finalización	20-50 50-82 82-120
	150 125 150	Crecimiento Finalización Verracos*	5-60 60-120 > 120
Madsen y Eriksen, 2001	100-150	Verracos*	> 120
Close, 2002	100-200	Crecimiento	20-50
	70-150	Finalización	50-120
Official Journal of the European Union, 2003.	150	Todas	-
BSAS, 2003	100 80 60	Crecimiento Finalización 1 Finalización 2	30-60 60-90 90-120
	120	Crecimiento/ Finalización	-
Mateos <i>et al.</i> , 2004	110	Crecimiento/ Finalización	20-50
Pupa <i>et al.</i> , 2005	80	Crecimiento/ Finalización	20-100
	80-125	Reproductores*	>120
Mateos <i>et al.</i> , 2005	100-150	Verracos*	8-12 meses
FEDNA, 2006	110-120 90-110 95-140	Crecimiento Cebo Verracos*	> 120
	125	Verracos*	> 120
Feedstuffs, 2006	125	Verracos*	> 120
PIC, 2006	95-140	Verracos*	> 120
ZINPRO, 2007*	100-200	Crecimiento/ Finalización	20-120
Close y Pierce, 2008	50-100	Todas	-
Hernández <i>et al.</i> , 2008	65-170	Crecimiento/ Finalización	25-107
PIC, 2008	100-120 125	Crecimiento/ Finalización Verracos*	27-68 >135
	100 100-150	Crecimiento/ Finalización Verracos*	20-105 > 120
VSP-Dk, 2010	125 100 75	Crecimiento/ Finalización	20-60 60-102 102-143
	165	Verracos*	> 120
Patience y Chipman, 2011	50-100 ppm	Crecimiento/ Finalización	25-127
FEDNA, 2013	100-130	Lechones	120
	110-120	Crecimiento	110
	90-110	Cebo	80
	95-140	Verraco	120

* Niveles usados en la industria (como suplemento); * En actividad sexual.

Dentro de las necesidades nutricionales del macho reproductor, en el momento de elaborar un pienso sólo se toman en cuenta el estado de mantenimiento, proporcionando al verraco un extra nutricional para reforzar sus actividades de ejercicio y monta, puesto que se considera que las condiciones de manejo y alojamiento del animal no generan gastos mayores o necesidades superiores a las aportadas por el pienso.

De forma rutinaria estas consideraciones no se valoran, y lo que es peor, con frecuencia, se suministra el pienso de hembras a los verracos, asumiendo que no hay diferencias ni efectos adversos en el semental (**García, 2010**).

2.8. Mecanismos que Controlan el Proceso Reproductivo del Verraco

El sistema neuroendocrino es el responsable del control y función de los órganos reproductivos mediante vías de señalización que son suministradas e influenciadas por ciertas hormonas. El control neuroendocrino desempeña un papel específico ya que constituye un sistema coordinador, para mantener la homeostasis del organismo mediante la regulación de las funciones corporales, reproductivas, metabólicas y conductuales (**McDonald, 1978; Hafez, 2000; Goodman, 2003; Cavinder et al., 2010**).

El sistema neuroendocrino está constituido por el sistema nervioso (mediador aferente) que lleva los impulsos hasta el hipotálamo y el sistema endocrino (hipófisis), que libera las sustancias humorales que actuarán periféricamente completando el sistema.

El sistema nervioso, es el responsable de llevar los estímulos externos captados por los sentidos (visuales, olfativos, auditivos, táctiles) y transmitirlos al cerebro el cual, traduce la información recibida y actúa enviando impulsos a través de las fibras nerviosas hasta su órgano de destino. El tiempo de respuesta del sistema endocrino es más lento, debido a que tiene que atravesar el torrente sanguíneo para poder liberar las señales que produzcan un efecto. Las sustancias que secreta son las hormonas (sustancias químicas liberadas en pequeñas cantidades) que provocarán una respuesta fisiológica en otras células o tejidos (diana). Ambos sistemas están perfectamente coordinados y son dependientes el uno del otro para mantener el medio interno (**McDonald, 1978; Hafez, 2000; Goodman, 2003**).

2.8.1. Estructuras Neuroendocrinas

Las estructuras responsables de las funciones endocrinas del organismo se denominan glándulas neuroendocrinas: hipotálamo e hipófisis anterior.

El hipotálamo ubicado en la superficie basal del encéfalo, es una región de gran importancia fisiológica debido a que interactúa con el sistema nervioso y el endocrino, además de estar directamente relacionado con la hipófisis. El sistema portal hipotálamo-hipófisis es la vía vascular que transporta las hormonas hipotalámicas a la hipófisis anterior (**McDonald, 1978; Hafez, 2000**).

La información percibida por los órganos sensoriales es controlada y posteriormente enviada al hipotálamo donde induce cambios en el comportamiento influenciando directamente la función reproductiva. El hipotálamo está sujeto a la diferenciación durante el desarrollo fetal (es más dependiente del sexo que de la función

cerebral). La diferenciación sexual de los genitales internos y externos requiere de la síntesis de andrógenos por los testículos fetales, produciéndose en cerdos a partir de las 4 semanas de gestación (**Hughes y Varley, 1984; Lacorn *et al.*, 2009**). La hipófisis juega un papel esencial en el sistema regulador endocrino, debido a que libera y regula la secreción de hormonas, además, en ella se produce la conexión de la regulación de los sistemas endocrino y nervioso, produciendo respuestas a determinados estímulos liberando hormonas al torrente sanguíneo que actuaran sobre un tejido diana (**McDonald, 1978; Hafez, 2000**).

El hipotálamo y la hipófisis, también son órganos diana, por lo que constituyen un sistema homeostático de retroalimentación mediante el cual regulan su ritmo de secreción hacia el resto del organismo.

2.8.2. Regulación del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas

La regulación neural producida por el cerebro es fundamental sobre las funciones gonadales a través de la regulación hipotalámica de la secreción de gonadotrofinas hipofisarias que son liberadas a la circulación. Las hormonas actúan sobre las gónadas, determinando el grado de madurez de los órganos reproductores y consecuentemente la maduración de las células germinales (**Hughes y Varley, 1984; Cole y Cupps, 1984; Oskam *et al.*, 2008**).

La actividad de este eje consiste en la secreción de hormonas del hipotálamo, las cuales liberan hormonas específicas que inducen la actividad de la hipófisis a verter hormonas a la circulación sanguínea las cuales actúan a nivel de las gónadas del animal (testículos), estimulando la liberación de testosterona hacia la sangre que actúa como reguladora de la retroalimentación clásica sobre las hormonas del hipotálamo e hipófisis.

Desde la perspectiva del hipotálamo, los sistemas reproductivos comprenden circuitos neuronales que regulan la secreción de hormonas, junto con el sistema nervioso central que controla la fisiología reproductiva. Dichos circuitos están condicionados por cambios relacionados con la edad de los animales, ya que en animales adultos se ve disminuida la secreción de algunas hormonas. El perfil de hormonas esteroides en el lechón macho es completamente diferente del perfil hormonal de los verraco adultos, con un pico pronunciado de testosterona en las primeras semanas de edad, que indica una actividad muy elevada del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, continuándose con un descenso de las concentraciones hormonales hasta llegar a la pubertad donde

determinadas hormonas aumentan considerablemente (Romeo *et al.*, 2002; Zamaratskaia *et al.*, 2007; Wu, 2009; Oberlender *et al.*, 2010; Oskam *et al.*, 2010).

Las principales hormonas implicadas en este proceso son la hormona liberadora de gonadotropinas (**GnRH**) producida y secretada por el hipotálamo, la cual se transporta a través de los vasos porta hipotálamo-hipofisario a la hipófisis para estimular la síntesis y secreción de gonadotropinas es decir, de la hormona luteinizante (**LH**) y la folículo estimulante (**FSH**). En el testículo se desencadena la producción y secreción de andrógenos y estrógenos por las células de Leydig y estrógenos e inhibina por las células de Sertoli. Además de estas hormonas también se produce la secreción de la hormona del crecimiento (**GH**), prolactina (**PRL**), adrenocorticotropina(**ACTH**) y hormona estimulante tiroidea (**TSH**). (Estienne *et al.*, 2000; Estienne *et al.*, 2004; Estienne y Harper, 2004; Estienne *et al.*, 2005; Kuster y Althouse, 2006; Zamaratskaia *et al.*, 2008b; Audet *et al.*, 2009; Einarsson *et al.*, 2009; Estienne *et al.*, 2009; Roser, 2009).

Existen mecanismos de retroalimentación para corregir o mediar en la secreción de una hormona por una glándula determinada, cuando esta haya alcanzado un nivel puntual en su célula efectora. En los machos, se sabe que la **LH** y la **FSH** estimulan la espermatogénesis y secreción de esteroides testiculares responsable del mantenimiento de la libido, así como la liberación de gonadotropina que controlan a través de mecanismos de retroalimentación negativa el eje hipotálamo-hipófisis-testículo. La **FSH** estimula a las células de Sertoli para la producción de una proteína ligadora de andrógenos (**PLA**), que se une a ellos para facilitar sus efectos en la diferenciación de las células germinales. La **LH** estimula a las células de Leydig para producirla secreción testicular de testosterona y estrógenos que llegan a todo el organismo vía sanguínea. Probablemente como consecuencia de la aromatización de la testosterona, las concentraciones circulantes de estradiol son elevadas en el verraco (Estienne *et al.*, 2000; Estienne *et al.*, 2004; Estienne y Harper, 2004; Tang *et al.*, 1997; Einarsson *et al.*, 2009).

La secreción de inhibina por las células de Sertoli mediante retroalimentación negativa, regula la secreción de FSH y viceversa. La **GnRH** regula la secreción y producción de **GH**. La concentración de andrógenos en el plasma sanguíneo en cerdos aumenta transitoriamente después del parto (4 semanas). Este aumento es importante para el desarrollo del comportamiento sexual y social, y probablemente tiene un efecto sobre el patrón de secreción de **GH**. Los testículos producen una gran cantidad de estrógenos por lo que el papel de estos en la secreción de proteínas del epidídimo (Lactoferrina) es de particular interés. La Lactoferrina es secretada por el epidídimo

detectándose altas concentraciones en plasma seminal (Hafez, 2000; Kuster y Althouse, 2006; Pearl y Roser, 2008; Einarsson *et al.*, 2009; Estienne *et al.*, 2009; Lacorn *et al.*, 2009; Roser, 2009).

En la mayoría de los mamíferos, el desarrollo normal de la espermatogénesis depende de la función del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Este sistema es un componente importante de la función testicular normal, regulación de la esteroidogénesis y espermatogénesis (Roser, 2009).

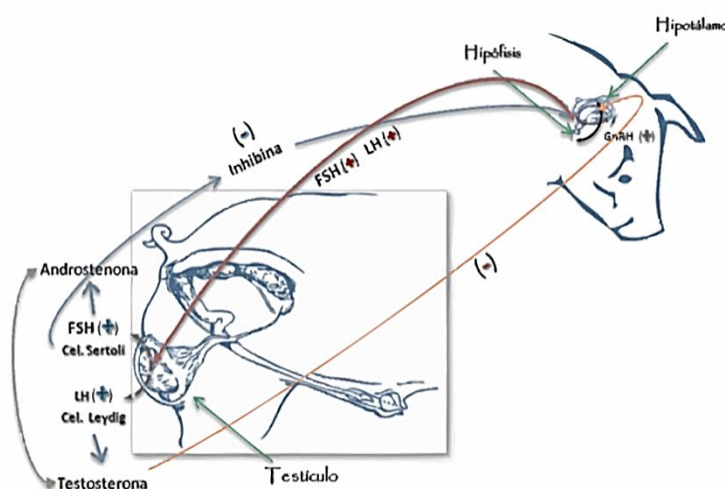


Ilustración 5. Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.

Estos mecanismos de retroalimentación son controlados por el cerebro. Las gonadotropinas activan la liberación de hormonas gonadales que interactúan con el sistema nervioso transmitiendo al cerebro señales que estimulan el inicio de los procesos reproductivos. La acción de las hormonas gonadales ejercida sobre el cerebro es un factor clave para el desarrollo y diferenciación de la función hipotalámica (**Ilustración 5**).

Los resultados de este proceso son la producción de una serie de cambios fisiológicos, correlacionados con cambios en el comportamiento, incluyendo el cortejo, la cópula y otros aspectos relacionados con la reproducción del macho. La conducta sexual masculina es dependiente de Testosterona y sus metabolitos (**E2**, **DTH**), por lo que, parece razonable suponer que la presencia de un mecanismo de retroalimentación positiva donde niveles elevados de androsterona y testosterona estimulan el comportamiento sexual y la agresividad en los verracos (Hughes y Varley, 1984; Cole y Cupps, 1984; Hull *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 1997; Fredriksen *et al.*, 2008).

2.9. Testículos

El efecto del **Zn** en los testículos, se manifiesta directamente en los conductos seminíferos, proporcionando control y estabilidad para el desarrollo de los túbulos seminíferos, además de participar en un crecimiento testicular adecuado.

El desarrollo de los testículos es esencial para establecer tres elementos clave en la función reproductiva de los machos: determinación y diferenciación del sexo; estimulación de los componentes somáticos de la pubertad; y estimulación de la espermatogénesis (Ieuan y Hughes, 2006). Las gónadas masculinas o testículos se localizan en la cavidad abdominal durante la etapa embrionaria, en la mayoría de los mamíferos, estos órganos descienden en periodos variables antes o después del nacimiento, hacia el *diverticulum* del abdomen llamado escroto, el cual constituye una estructura abolsada derivada de la piel y la fascia de la pared abdominal, proporcionando protección al tiempo que regulan la temperatura. La mayor parte de la superficie del testículo está cubierta por una membrana serosa (*túnica vaginal*). A continuación, se localiza la *túnica albugíneafibromuscular*. Cada testículo se encuentra suspendido en el escroto por el extremo de un pedicelo vascular de tejido conjuntivo llamado cordón espermático (formado por el conducto deferente, vasos sanguíneos y nervios), el cual los conecta con el resto del sistema reproductor ya que pasa a través de la abertura de la pared abdominal llamada canal inguinal. A nivel del ligamento epididimal, penetran extensiones en el parénquima para unirse en un núcleo central de tejido conectivo, que corre a través de los testículos, llamado mediastino. De la cara profunda de la túnica albugínea y del borde de unión testicular se distingue un tabique fibroso que divide el parénquima en lóbulos, los cuales forman un conjunto llamado túbulos seminíferos que al inicio son muy tortuosos y estos forman túbulos rectos más largos que al ensamblarse a sus adyacentes convergen en la llamada *rete testis*. Estos túbulos en la parte craneal del borde del testículo, se unen y entran en la cabeza del epidídimo (McDonald, 1991; Hafez, 2000).

La barrera hemato-testicular es importante para el control local testicular, la existencia de barreras restrictivas en diferentes niveles del testículo (Endotelio Vascular, Capa Mioides, Células de Sertoli), permite la creación de micro-ambientes, no sólo dentro de los túbulos seminíferos, sino también fuera de estos en el espacio intersticial. Dichos micro-ambientes interactúan en el funcionamiento de los diferentes tipos celulares para el desarrollo coordinado y la multiplicación de las oleadas de células germinales que

posteriormente permitirán la aparición de las fases del ciclo espermato-genico (**Sharpe, 1983; Lunstra et al., 2003**).

Los testículos tienen básicamente dos funciones, una endocrina y otra la producción de espermatozoides. Ambos procesos tienen lugar en compartimentos diferentes: el primero se localiza en la zona vascularizada del tejido intersticial, Células de Leydig, y el segundo tiene lugar en el epitelio de los túbulos seminíferos. La función testicular está regulada por una gran cantidad de genes y productos genéticos, por la compleja interacción de muchas moléculas diferentes que incluyen tanto la señalización paracrina como la endocrina, y la conjunción adecuada de estas para obtener una capacidad reproductiva óptima. Dentro de las funciones de los testículos, se incluye la inducción y mantenimiento de la espermatogénesis y para ello requiere una interacción continua y controlada de varias hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-testículo (**Oskam et al., 2008; Audet et al., 2009; Kato et al., 2010**).

Los resultados de varios estudios han demostrado complejas interacciones entre los compartimientos seminíferos e intersticiales de los testículos durante su desarrollo. La formación de esteroides en los testículos de fetos de cerdo, señala un primer aumento en la biosíntesis de andrógenos en torno a los 30 días de gestación. El crecimiento testicular normal, la supervivencia de las células germinales, y posteriormente la espermatogénesis, parecen estar influenciados por el estrógeno. La presencia de receptores de estrógeno en las Células Germinales, Células de Leydig y Células de Sertoli en diferentes etapas del desarrollo testicular en el verraco está en relación con la presencia de eventos paracrinós/autocrinós. La síntesis de estrógenos es catalizada por la enzima aromatasa, que se expresa en las células de Leydig, así como la producción de testosterona, andrógeno secretado por los machos adultos. La **FSH** se considera importante para el inicio de la espermatogénesis durante el desarrollo posnatal testicular (**Kaminski et al., 1999; França et al., 2000; França et al., 2005; At-taras et al., 2006; Haeussler et al., 2007; Oskam et al., 2008; Audet et al., 2009**).

La red avanzada y organizada de los cordones testiculares en los testículos de verraco se forma a partir de los 34 días de gestación en la línea genética Yorkshire, mientras que en los Meishan a los 42 días. Distintas publicaciones indican que el porcentaje del volumen ocupado por los tejidos espermato-genéticos aumentan con la edad, peso corporal y peso de los testículos en los verracos, siendo evidente una

estrecha relación entre las actividades endocrinas, espermatogénicas y el desarrollo testicular de los verracos (Ugwu *et al.*, 2009).

Diversas investigaciones indican que en verracos maduros existen diferencias entre razas y líneas genéticas en cuanto al desarrollo y peso de los testículos. Se señala que verracos con un notable desarrollo testicular presentan concentraciones menores de **FSH** que en cerdos (Meishan) con testículos particularmente pequeños (Lunstra *et al.*, 1997; Wise *et al.*, 2003; Ugwu *et al.*, 2009).

2.9.1. Proliferación Celular

En los testículos del cerdo se producen cambios morfológicos y dinámicos. Durante el primer mes del nacimiento, con aumento de proliferación celular, síntesis de andrógenos y estrógenos. Estos cambios, son coordinados por las Células de Sertoli (**CS**), Células de Leydig (**CL**), y Células Germinales (**CG**). En los mamíferos, todos los tipos de células germinales se encuentran en el epitelio germinal, las cuales incluyen unas asociaciones de diferentes tipos de células (células peritubulares mioideas, células endoteliales, fibroblastos), organizadas en tiempos (Lunstra *et al.*, 1986; França *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2006; Ford *et al.*, 2006; Ieuan y Hughes, 2006; Choi *et al.*, 2009).

2.9.2. Células de Sertoli

Las células de Sertoli (**CS**) juegan un papel fundamental en el desarrollo funcional de los testículos, proporcionando un medio de nutrición y protección para el desarrollo de las células germinales y por lo tanto en la expresión del fenotipo masculino. Las células pre-Sertoli son el primer tipo celular somático que se puede diferenciar en la gónada fetal indiferenciada. Estas células, probablemente se originan en el epitelio celómico y sus precursores se cree que expresan la determinación del sexo masculino mediante el **gen Sry** en el brazo corto del cromosoma Y. Durante el desarrollo testicular temprano, las **CS** secretan la hormona anti-Mülleriana (**AMH**) la cual suprime el desarrollo del tracto reproductivo femenino. Estas células participan en dos procesos funcionalmente separados: en la formación de los testículos o diferenciación sexual y en la espermatogénesis (Mackay, 2000; McCoard *et al.*, 2001; Sharpe *et al.*, 2003; França *et al.*, 2005).

Por tanto, las **CS** desempeñan un papel crucial en la diferenciación del testículo. En los cerdos estos eventos comienzan en el embrión de 26 días aproximadamente. La diferenciación de estas células permite la formación del cordón seminífero, condicionando la entrada de las células germinales en las fases de meiosis, así como, la diferenciación y funcionalidad de las células de Leydig (Mackay, 2000; McCoard *et al.*, 2001;

Sharpe, 2003; França et al., 2005). La primera onda de proliferación de **CS** en los verracos se produce entre la primera y quinta semana de edad, y la segunda entre la décima y dieciseisava semana de vida, con lo que el número de **CS** es un determinante importante de la capacidad de producción de espermatozoides asociada a el peso testicular (**Legacki et al., 2015**). Durante estos primeros meses de vida, se eleva la producción de **FSH**, y la maduración de las **CS**, la cual continúa a través de la pubertad mediante la formación de la barrera hemato-testicular a los 4 meses de edad. Debido a que la división de las **CS** se detiene antes de la pubertad, el número de células establecido durante el período prepuberal determinara el tamaño final de los testículos y el número de espermatozoides que producirán los machos sexualmente maduros, por lo que se puede señalar que la población de células ya establecida a partir de entonces, sólo admite un número limitado de células germinales, y la capacidad de soporte de estas células es variable y específica de especie. Sin el apoyo físico y metabólico de las **CS**, la diferenciación de las **CG**, meiosis y la transformación en espermatozoides no ocurriría (**Ford et al., 1997; França et al., 2000; McCoard et al., 2001; Lunstra et al., 2003; Sharpe, 2003; França et al., 2005; Ford et al., 2006; Almeida et al., 2006**).

La **FSH**, es el principal factor responsable de la proliferación de las **CS** en la especie porcina durante el periodo posnatal (número de células por testículo aumenta varias veces), mientras que la hormona tiroidea (**T3**) es responsable del cambio de estas células de una fase de mitosis a una fase de no-mitosis, que se produce antes de la pubertad. Algunos trabajos sugieren que la mitosis de las **CS** en cerdos, se produce principalmente durante el primer mes después del nacimiento, y que un segundo periodo de expansión se lleva a cabo entre el tercer y cuarto mes, coincidiendo con la maduración de estas células (desarrollo de la barrera de las **CS**, secreción de fluido y flujo tubular, desarrollo del citoesqueleto de actina, espermatogonias extendidas, así como la formación de espermatoцитos primarios). Estos períodos de mayor proliferación de células coinciden con niveles plasmáticos elevados de **FSH** y un aumento de seis veces la longitud de los túbulos seminíferos (**França et al., 2000; McCoard et al., 2001; Lunstra et al., 2003; França et al., 2005; At-taras et al., 2006; Haeussle et al., 2007; Audet et al., 2009**).

Esta maduración supponela pérdida de la capacidad proliferativa de las células, y con ello la expresión de sus funciones (los procesos ocurridos en las **CS** durante su "periodo fetal" hasta cierto punto predeterminaran su función o comportamiento en la

edad adulta). Dichas funciones se manifiestan principalmente en dicha fase, para regular la espermatogénesis. Debido a que estas células, están protegidas por una proteína anti-apoptótica la muerte de estas, puede observarse normalmente en el epitelio seminífero de animales que ya han alcanzado la madurez sexual (**Lunstra et al., 2003; Sharpe et al., 2003; França et al., 2005**).

Dentro de las funciones de las **CS**, se incluyen la regulación de genes, prestación de apoyo estructural y nutrición para el desarrollo de las **CG**, la compartimentación de los túbulos seminíferos (entorno de protección celular), fagocitosis de células degeneradas y cuerpos residuales, secreción de fluidos, proteínas y factores de crecimiento, liberación de espermátidas en la espermiación y la producción de una serie de proteínas que regulan y/o responder a la liberación de hormonas pituitarias que intervienen en la actividad mitótica de las espermatogonias, así como influir en la proliferación de las células de Leydig. Las **CS** pueden considerarse un mediador fundamental de la acción de **FSH** y **LH** estimuladas por la producción de testosterona por parte del testículo y probablemente dependiente de la etapa de desarrollo (**McCoard et al., 2001; França et al., 2005; Johnson et al., 2008**).

2.9.3. Células de Leydig

Las Células de Leydig (**CL**) o esteroidogénicas, junto con las **CS** son los mayores componentes endocrinos del testículo, debido a que tienen capacidad de sintetizar y secretar esteroides, además de enzimas y péptidos. Estas células ocupan el 50% del compartimento intertubular testicular. Por ello, las **CL** son ampliamente conocidas por su función endocrina, ya que estas células se disponen alrededor de los vasos sanguíneos, con lo cual su ubicación facilita el paso de los esteroides a la circulación (**Campo, 2009**).

La función de las **CL** es controlada mediante la acción de la hormona luteinizante (**LH**) secretada por la hipófisis. Sin embargo, muchos estudios indican que la hormona folículo estimulante (**FSH**), también juega un papel importante en el control e incremento de la función de estas células (**Lunstra et al., 1986; Almeida et al., 2006; Chandrashekar y Bartke, 2007; Audet et al., 2009**).

Durante el desarrollo fetal y los primeros cuatro meses de vida, la población de **CL** en los cerdos efectúa una sucesión de fases alternando etapas de desarrollo y de quiescencia. En contraste con la mayoría de los mamíferos, que manifiestan un patrón bifásico de desarrollo, en los cerdos se han descrito tres fases o periodos: dos fases transitorias (una fase fetal y otra durante el primer mes de nacimiento) y una tercera o

fase final (durante el periodo prepuberal hasta la maduración sexual) (**Hesketh, 1982; Lunstraet al., 1986; Geiger, 1997; França et al., 2000; França et al., 2005**).

La primera fase, que se produce durante el período fetal (entre los 26 y 60 días de gestación), está relacionada con el desarrollo del tracto genital masculino, ya que la producción de testosterona en esta etapa es la responsable de la masculinización de los órganos sexuales primarios del feto (presentando un nivel máximo de testosterona entre los días 35 y 38). Los testículos fetales inician su descenso hacia el escroto, desarrollando su propia población de células, con una morfología típica y producción de esteroides conforme a esta etapa del desarrollo testicular. El equilibrio entre andrógenos y estrógenos durante este periodo es también muy importante (**Ford et al., 1980; Lunstraet al., 1986; Adham et al., 1993; Benton et al., 1995; Geiger, 1997; Haeussle et al., 2007; Hutson et al., 1997; Geiger et al., 1999; Sharpe, 2001; França et al., 2005**).

Las poblaciones de **CL** se identifican como fetales y adultas, debido a su etapa de diferenciación o desarrollo. Estos procesos de diferenciación se establecen por ciclos:

- » 1^{er} ciclo: Proliferación de células precursoras (células mesenquimales) en el intersticio testicular.
- » 2^{do} ciclo: Diferenciación de células precursoras de **CL** a células progenitoras.
- » 3^{er} ciclo: Cambio de células progenitoras a **CL** adultas recién formadas.
- » 4^{to} ciclo: Transformación de **CL** adultas recién formadas a células adultas inmaduras.
- » 5^{to} ciclo: Maduración de las **CL** (paso de células adultas inmaduras a **CL** adultas y maduras) (**Mendis-Handagama y Ariyaratne, 2001**).

Las células fetales de Leydig (identificadas en embriones de cerdo por primera vez en 1904) se hacen visibles en el espacio intersticial testicular que rodea a los túbulos seminíferos, las cuales están organizadas en grupos rodeados de una membrana basal y una envoltura de fibroblastos en forma de huso. Dicha membrana es casi continua durante el periodo fetal y haciéndose discontinua después del nacimiento. Presentan un ligero aumentando en tamaño, poseen núcleo grande y redondo, aparato de Golgi, abundantes cantidades de retículo endoplasmático liso (**REL**), mitocondrias y muchas agrupaciones de gotas de lípidos (0.9µm) (**Lunstraet al., 1986; van Straaten y Wensing, 1978; Adham et al., 1993; Geiger, 1997; Kaminski et al., 1999; Wen et al., 2011**).

El único mamífero conocido que genera una onda fetal de proliferación y diferenciación de estas células es el cerdo. Dicha oleada, coincide con niveles elevados de **LH** que se pueden detectar en suero a los 85 días de gestación, seguido por un aumento sistematizado de testosterona (**Hesketh, 1982; Geiger, 1997**).

Después del nacimiento, el proceso de diferenciación de las **CL** sigue de forma ondulatoria con la diferenciación de células fusiformes a células poligonales. El primer paso en el proceso de diferenciación, es la transformación de células precursoras a células progenitoras de Leydig. Estas células progenitoras son morfológicamente indistinguibles de las precursoras, pero son fundamentales en el linaje de las **CL** ya que estas expresan enzimas esteroidogénicas y pueden producir andrógenos. Tiene receptores inactivos para **LH**, por lo que se establece que el inicio de la diferenciación de precursoras a progenitoras es independiente de la **LH**. Sin embargo, esta hormona es esencial para las etapas posteriores en el linaje de las **CL**. En esta etapa el número de células fetales por cada testículo es extremadamente pequeño (**Kaminski et al., 1999; Ariyaratne et al., 2000; Mendis-Handagama y Ariyaratne, 2001**).

La población fetal de estas células, experimenta un proceso de regresión durante el desarrollo de los testículos (aproximadamente a las cinco semanas del nacimiento), presentándose la segunda fase u oleada transitoria en el desarrollo de las **CL**, con un especial aumento en el volumen celular producido durante el primer mes después del nacimiento (mayoritariamente entre la segunda y tercera semanas de edad) el número de células mesenquimales y de Leydig se eleva linealmente (relación 1:2). En estas oleadas, las células experimentan un proceso de proliferación y diferenciación. Continúa con un periodo de des diferenciación y finalmente la regresión celular. Durante esta regresión, las concentraciones séricas de testosterona disminuyen (**van Straaten y Wensing, 1978; Lunstra et al., 1986; Geiger, 1997; França et al., 2000; Mendis-Handagama y Ariyaratne, 2001; Choi et al., 2009**).

El siguiente paso en dicho desarrollo es el de células progenitoras a células adultas recién formadas, las cuales morfológicamente se vuelven cada vez más redondas (poligonales). Su contenido citoplasmático es pequeño, el núcleo es grande y prominente, el contenido de gotas de lípidos es escaso o nulo y comienzan a migrar de su posición peritubular en dirección del intersticio testicular central. Posteriormente, ocurre el cambio a células adultas inmaduras, el cual se hace notorio debido al aumento de tamaño de la célula (más contenido citoplasmático) y mayor cantidad de gotas de lípidos (el número y tamaño de estas gotas en las células inmaduras adultas es más reducido que el número de gotas presentes en las células fetales). Este tipo de células adultas inmaduras son las

más predominantes del linaje celular de Leydig, y son las que estimulan la acción de elevados niveles de enzimas que metabolizan testosterona como la **5 α -reductasa** y **3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa**, por lo que estas células producen principalmente **Androstano-3,17-diol** y **androstenediol** en lugar de testosterona (**Lunstraet al., 1986; Ariyaratne et al., 2000; Mendis-Handagama y Ariyaratne, 2001**).

La tercera etapa de desarrollo de las **CL**, comienza cerca de las 13 semanas de vida, durante este periodo prepuberal y hasta la edad madura se lleva a cabo el desarrollo de la población definitiva de **CL**, que caracterizaran al verraco adulto (**van Straaten y Wensing, 1978**). Por lo que, el último paso en el desarrollo de estas células durante esta etapa prepuberal, es la transformación de células inmaduras adultas a **CL** maduras, etapa que se identifica por un aumento significativo en el tamaño de las células.

Las **CL** adultas, contienen núcleos grandes y redondos con uno o dos nucléolos y grandes cantidades de retículo endoplasmático liso, numerosas mitocondrias túbulo-vesiculares, un aparato de Golgi bien diferenciado y gotas de lípidos relativamente pequeñas (0.5 μ m). A diferencia de las fetales no se encuentran en la membrana basal, no hay formación en racimos y no presentan fibroblastos (**Lunstraet al., 1986; Mendis-Handagama y Ariyaratne, 2001; Wen et al., 2011**).

La hormona **LH**, esencial para esta etapa final interviene en la proliferación, hipertrofia, y establecimiento de los orgánulos completos requeridos para la función androgénica. Se eleva de manera significativa la producción de testosterona, y aumenta la capacidad de respuesta a la **LH** circulante debido al incremento del número de receptores para esta hormona. Por lo tanto, hay una mayor actividad enzimática que permite la biosíntesis de testosterona, y con ello, el cambio a la pubertad y posteriormente el mantenimiento y regulación del proceso de espermatogénesis (**Benton et al., 1995; Mendis-Handagama y Ariyaratne, 2001; Wen et al., 2011**).

La participación de las **CL** en la producción de hormonas durante este último periodo, es la responsable del desarrollo de las características sexuales masculinas secundarias, desarrollo puberal del aparato reproductor, además del mantenimiento funcional de los órganos y estructuras que son andrógeno-dependientes, como las glándulas sexuales accesorias y en consecuencia la espermatogénesis en el verraco adulto (**Benton et al., 1995; Geiger, 1997; Geiger et al., 1999; França et al., 2000; França et al., 2005; Audet et al., 2009**).

2.9.3.1. Función de las Células de Leydig

Las **CL** son las principales responsables de la producción de Testosterona, necesaria para mantener las funciones de las **CS** en los machos adultos e indirectamente en los procesos de mantenimiento de la espermatogénesis. El aumento en la proliferación de **CS** y el desarrollo de los cordones testiculares, más o menos es paralelo a la diferenciación de las **CL** (**Imagen 1**). Las concentraciones de testosterona presenta un patrón similar al de desarrollo de las **CL**, identificando como la principal fuente de testosterona en esta etapa de desarrollo a las células mesenquimales (**Kaminski et al., 1999; França et al., 2005; Haeussle et al., 2007; Choi et al., 2009**). Debido a que la síntesis de andrógenos y estrógenos se producen principalmente en estas células, representan el tejido endocrino del testículo.

Dichos eventos están regulados por una serie de enzimas esteroidogénicas, las cuales se ha demostrado que en testículos de verraco su expresión y actividad es dependiente de una gran variedad de factores extra e intra gonadales (**Adham et al., 1993; Geiger, 1997; França et al., 2000; França et al., 2005; Choi et al., 2009**).

Las concentraciones de testosterona disminuyen después de presentar un nivel elevado a los 38 días fetales y se mantiene en niveles bajos durante el resto del desarrollo fetal, presentando un aumento considerable a las 4-6 semanas después del nacimiento (**Ford et al., 1980; Schwarzenberger et al., 1993; Haeussle et al., 2007**).

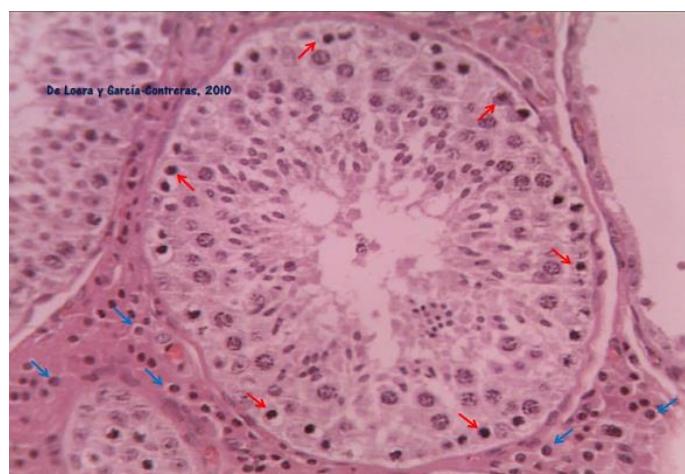


Imagen 1. Corte histológico de testículo de cerdo: sección de túbulos seminíferos identificando la presencia de células de Sertoli, así como la diferenciación de la zona intersticial donde se puede observar la presencia de Células de Leydig (De Loera y García-Contreras, 2010).

Más que el número y tamaño de las **CL**, la cantidad de retículo endoplasmático liso contenido en las mismas, es el mejor indicador de la capacidad de estas para producir testosterona ya que en su superficie contiene numerosas enzimas que son

necesarias para la esteroidogénesis (**Campo, 2009**). Está bien documentado que en los cerdos, el volumen individual de las células, el número de receptores para **LH** y la testosterona plasmática cambian sustancialmente durante los diferentes períodos de desarrollo de los testículos. Su principal función es sintetizar andrógenos, factores de crecimiento y varias hormonas, tales como **TGF α** (factor de crecimiento transformante alfa: proliferación de células epiteliales y mesenquimales), **TGF β** (factor de crecimiento transformante beta), **IGF-1** (factor de crecimiento insulínico tipo 1), hormona tiroidea (**TH**), andrógenos, estrógenos, hormona anti-Müllerian, y macrófagos, que son importantes reguladores de la proliferación y diferenciación de las **CL**, así como el factor ligado a insulina tipo 3 (**INSL3**) o factor ligado a relaxina, producido casi exclusivamente por las **CL** y que interviene en la diferenciación de estas células jugando un papel vital en los eventos de masculinización, impronta masculina del cerebro y posteriormente durante el desarrollo fetal el descenso de los testículos al escroto. Varias de las enzimas necesarias para la esteroidogénesis y síntesis de testosterona están presentes durante la etapa fetal temprana de desarrollo de las **CL** (**Lunstra et al., 1986; Hutson et al., 1997; Kaminski et al., 1999; Sharpe, 2001; Sharpe et al., 2003; França et al., 2005; Weissman et al., 2005; Almeida et al., 2006; Ferlin et al., 2006; Chandrashekar y Bartke, 2007; Wen et al., 2011**).

2.9.4. Células Germinales

Antes de la diferenciación sexual las células germinales primordiales (**CGP**) o gonocitos, emigran desde la región del endodermo del saco vitelino a las eminencias genitales. Las **CGP** procedentes del epitelio germinal invaden la médula de la eminencia genital para formar los cordones sexuales primarios (**McDonald, 1991**).

La proliferación de células germinales es el factor principal responsable del crecimiento de los túbulos seminíferos, tanto endiámetro como longitud que se produce después del primer mes de nacimiento. Aunque como estas células en el cerdo son eventualmente insensibles a la acción de las gonadotrofinas, **França et al. (2000)**, señalan que la tasa de crecimiento de las **CG** durante el primer mes del nacimiento es aproximadamente la mitad que la observada en las **CS** y longitud tubular. Además, durante este período, los gonocitos se encuentran en estado de mitosis, mientras que los procesos de apoptosis en estas células son poco frecuentes (**França et al., 2000; França et al., 2005**).

El número total de **CG** en el testículo aumenta continuamente, mostrando una expansión drástica en la sección transversal de los túbulos seminíferos a los 4-5 meses de edad y una estabilización de su población después de los siete meses de edad. En la espermatogénesis (fase proliferativa) en la cual las **CGP** se multiplican por una serie de divisiones mitóticas seguidas de una cadena de divisiones meióticas que producen el estado haploide la célula somática. La espermatogénesis es la fase de diferenciación en la que el núcleo y citoplasma sufren cambios morfológicos para constituir su transformación a la célula espermática (**McDonald, 1991; França et al., 2000**).

Mediante varios parámetros, tales como el peso de los testículos, diámetro tubular, liberación de espermatozoides del epitelio seminífero, evolución de la espermatogénesis y los niveles plasmáticos de testosterona, se desencadena la pubertad y seguidamente la madurez sexual. Eventos que se llevan a cabo en la mayoría de las razas de cerdos entre las 20 y 32 semanas de edad (**França et al., 2005**).

2.10. Epidídimo

El epidídimo es un conducto extremadamente largo de más de 20cm, que contiene aproximadamente 50m de un túbulo contorneado que esta unido a la pared dorsal de la superficie lateral del testículo. Presenta tres regiones: cabeza, cuerpo y cola. Estas subdivisiones se basan en los parámetros funcionales y estructurales. Anatómicamente consiste en un conducto único, muy contorsionado sobre sí mismo, el cual une los conductos eferentes a los deferentes (**Hafez, 2000; Hermo y Robaire, 2002; Bassols, et al., 2005; Oyeyemi y Ubiogoro, 2005; Guyonnet et al., 2009; Karunakaran et al., 2009**).

Histológicamente se presenta como múltiples túbulos separados por un estroma delgado intensamente vascularizado, cubierto por una túnica albugínea (fibras colágenas y elásticas). El epitelio del epidídimo, está rodeado por una capa de estroma, varios tipos de células epiteliales rodean el epidídimo y algunas están localizadas a lo largo del conducto, mientras que otras se encuentran exclusivamente en zonas específicas. Estas células se pueden clasificar en cuatro tipos: **Principales** (células columnares, actúan en el transporte, secreción, síntesis y absorción de moléculas), **Basales** (papel activo en la desintoxicación), **Claros** (eliminan materiales del lumen), y **Halo** (forman parte del sistema inmunológico) (**Robairey Viger, 1995; Hermo y Robaire, 2002**). Este órgano tiene una gran actividad para sintetizar proteínas (146 proteínas en epidídimos de cerdo). Esta síntesis depende de los niveles de andrógenos y de factores testiculares. Estas proteínas intervienen en los cambios de membrana de los espermatozoides, así como en

la regulación de la integridad estructural y funcional del propio epidídimo (**Okamura *et al.*, 1995; Syntin *et al.*, 1996**).

Las funciones principales del epidídimo son: transporte, maduración y almacenamiento espermático. Los espermatozoides recién formados en el testículo son transportados por la actividad peristáltica del conducto epididimario y el epitelio ciliado de los conductos eferentes. En la cabeza y cuerpo se produce la maduración de las células espermáticas que llevarán al desarrollo de la capacidad fecundante de los mismos. En la cola del epidídimo se produce el almacenamiento de los espermatozoides ya maduros (**Hafez, 2000; Bassols *et al.*, 2005; Oyeyemi y Ubiogoro, 2005; Karunakaran *et al.*, 2009**).

Los espermatozoides sufren una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos durante su tránsito por el epidídimo. Algunos de estos cambios se pueden atribuir a su interacción con las secreciones específicas del epitelio epididimario, las cuales se acumulan en las diferentes regiones del mismo, por lo que, la producción de un eyaculado normal dependerá de la combinación de varios factores, dentro de estos está el desarrollo normal del tracto reproductivo y por ende del proceso de espermatogénesis, maduración y transporte de espermatozoides normal (**Briz *et al.*, 1995; Jubb y Palmer's, 2002**).

2.11. Pubertad en el Macho

En porcino, los sementales seleccionados y destinados como reproductores, no se recomienda utilizarlos antes de los siete meses de edad. La información existente señala que la presentación de la pubertad en los verracos es alrededor de los cinco a ocho meses de edad (dependiendo de la raza y línea genética). Sin embargo, los verracos de 4.5 a 5 meses de edad ya presentan espermatozoides en el epidídimo, pero la presencia de la libido y eyaculación generalmente aparece después de los cinco meses. Por ello, los animales jóvenes incluidos en un programa de reproducción, son seleccionados por aspectos asociados a los procesos de pubertad, comportamiento, madurez sexual, reproductiva y rendimiento sexual. Este primer periodo implica el crecimiento adecuado de los órganos reproductivos, desarrollo de la conducta sexual y aumento de la espermatogénesis que culminarán con la madurez sexual y la fertilidad del semental. A pesar de que la pubertad en el macho es un punto de referencia importante para determinar la futura vida reproductiva y productiva de un animal, la información disponible

sobre este hecho es más bien escasa. La eficiencia reproductiva de un verraco sólo dependerá de la aparición de la pubertad sino también de la calidad seminal del mismo. El uso de reproductores porcinos de alto rendimiento debería de estar dirigido a mejorar las prácticas de manejo, conocimiento de los aspectos reproductivos de los verracos jóvenes, adelantando su entrada en producción, optimizando con ello el máximo rendimiento (**Hughes y Varley, 1984; Bertani et al., 2002; Kuster y Althouse, 2006; Oskam et al., 2008; Sonderman y Luebbe, 2008; Zamaratskaia et al., 2008b; Gbore, 2009; Oberlender et al., 2010**).

La pubertad, se puede definir como un proceso de cambios por el cual un organismo adquiere la capacidad de desarrollo y organización de un conjunto de mecanismos fisiológicos, neuronales, endocrinos y anatómicos (secreción de hormonas, desarrollo de órganos sexuales, producción de células espermáticas y características sexuales “líbido”) que desempeñan un papel fundamental en la manifestación del comportamiento reproductivo (monta, eyaculación y fecundación de la hembra) y que conducen a la madurez sexual (**Zamaratskaia et al., 2005; Kuster y Althouse, 2006; García y De Loera, 2007; Oskam et al., 2008**).

El desarrollo puberal en los machos se inicia con el aumento de tamaño de los órganos reproductores (expansión/ensanchamiento, desarrollo luminal y secreción de fluidos en los túbulos seminíferos, acompañado de un notable aumento del volumen testicular y de las glándulas bulbouretrales). La proliferación de las **CS** cesa en asociación con la formación de la barrera hemato-testicular (cuatro meses de edad en razas comerciales). Estos cambios son seguidos por la liberación de espermatozoides maduros y su tránsito hacia el mediastino. Cuando se acerca la pubertad, los niveles de androstenona y testosterona aumentan en paralelo, por lo que se considera que estos niveles son expresiones de la capacidad esteroidogénica del individuo, así como la presencia y número total de **CL** en los testículos (**Franca et al., 2000; Zamaratskaia et al., 2005; Oskam et al., 2008; Oberlender et al., 2010; Oskam et al., 2010; Ford y Wise, 2011**).

El inicio de la pubertad constituye una fase importante en el desarrollo neuronal. Durante esta fase, estímulos sensoriales actúan activando circuitos neuronales responsables en la expresión de la conducta reproductiva debido a que la síntesis y liberación de una serie de hormonas (Testosterona) y metabolitos (Estradiol, Dihidrotestosterona, Aromatasas, o Enzimas Reductasas) son capaces de estimular la secreción de gonadotropinas y favorecer el desarrollo de la pubertad, presentación del

comportamiento y de la actividad reproductiva del animal (**Ogawa et al., 1997; Tang et al., 1997; Romeo et al., 2001; Romeo et al., 2002; Zamaratskaia et al., 2008a; Oberlender et al., 2010**).

La aparición de la pubertad en el macho depende fundamentalmente de un aumento de secreción de progesterona y **FSH**. Durante el periodo posterior al nacimiento los niveles de **FSH**, **LH** y testosterona son bajos, debido a que la testosterona actúa mediante retroalimentación negativa sobre la secreción de gonadotropinas. Sin embargo antes de la pubertad, el hipotálamo se hace menos sensible a este efecto negativo, la **GnRH** es liberada con mayor frecuencia implicando incremento de la producción de **FSH** y **LH**. Esta última, se une a los receptores de las **CL** para aumentar la esteroidogénesis. Dicha hormona se eleva gradualmente a lo largo de la maduración del animal. La aparición temprana de la pubertad en algunas razas o líneas genéticas, marca el inicio de la madurez sexual de los verracos, debido al incremento en la secreción de andrógenos testiculares (**Hughes y Varley, 1984; Romeo et al., 2002; Zamaratskaia et al., 2005; Zamaratskaia et al., 2007; Sonderman y Luebbe, 2008; Zamaratskaia et al., 2008a; Ford y Wise, 2009; Oberlender et al., 2010**).

Como es difícil la identificación de los factores que controlan la aparición de la pubertad en los verracos se emplean criterios prácticos para evaluar esta etapa del desarrollo. Los criterios utilizados habitualmente son el comportamiento del animal, edad a la primera eyaculación, concentración espermática en el eyaculado y la capacidad de fecundación de dichos espermatozoides. Sin embargo, para determinar la pubertad en los sementales a través de las concentraciones hormonales, la literatura señala dos tipos de pruebas. Como la mayoría de estas hormonas son secretadas de manera pulsátil, no se puede establecer claramente el estado hormonal de los animales. Usualmente se realizan estimaciones de la concentración de esteroides gonadales liberados a la circulación plasmática, pero estas pruebas no siempre son representativas del estado hormonal de los animales. En cambio, existen otras pruebas con las que se determina la presencia de estos esteroides (en forma soluble) en el tejido adiposo, debido a que dichas hormonas están menos influenciadas por las variaciones pulsátiles, con lo cual se puede obtener una valoración general y más aproximada de los niveles hormonales presentes en el organismo (**Claus y Hoffmann, 1980; Zamaratskaia et al., 2005; Oskam et al., 2008**).

2.11.1. Factores que Influyen en la Aparición de la Pubertad

La pubertad es un periodo crítico para determinar el comportamiento sexual y está relacionado con la edad, peso vivo, y la genética del individuo. Se ha demostrado que factores ambientales (altas temperaturas), sociales (aislamiento), instalaciones inadecuadas, nutricionales (restricción alimenticia, bajos niveles de proteínas, deficiencias de minerales), endocrinos (disminución de las secreciones hormonales), o físicos (lesiones, problemas de patas) en el animal, tendrán un impacto sobre la aparición de la pubertad, maduración y comportamiento sexual (**Einarsson et al., 1979; Hughes y Varley, 1980; Manteca et al., 2002; Romeo et al., 2002; Zamaratskaia et al., 2005; García y De Loera, 2007; Hull y Rodríguez-Manzo, 2009**).

Los efectos de las hormonas en el cerebro durante el desarrollo de la pubertad son moduladores importantes de la maduración y la conducta, por lo que alteraciones hormonales durante este periodo tanto fisiológicas como de comportamiento se reflejan en los animales adultos (**Ogawa et al., 1997; Hull y Rodríguez-Manzo, 2009**).

La edad a la pubertad tiene una heredabilidad estimada de 35%. Esta, puede verse afectada por cambios ambientales, nutricionales, raza o por la selección genética (**Clutter et al., 2001; García y De Loera, 2007**). Entre razas, es sabido que animales híbridos son más precoces a la aparición de la pubertad, que los animales puros. En verraco línea materna la pubertad aparece aproximadamente dos meses después (8 a 9 meses) de la edad en la que se presenta en animales de líneas terminales (6 a 7 meses) (**Zamaratskaia et al., 2005; Sonderman y Luebbe, 2008; Ford y Wise, 2009**).

Factores ambientales e interacciones sociales también pueden modificar o retrasar el inicio de la pubertad. Animales jóvenes criados o mantenidos en grupos ya sean mixtos o sólo machos, facilita la aparición de la pubertad. La razón de este hecho puede estar relacionado con los patrones de conducta sexual que se desarrollan durante la fase de crecimiento, por lo que el contacto físico (montar a otros animales), la presencia de olor sexual debido a la producción de feromonas es importante. El olor sexual en los machos antes de la pubertad es bajo, pero aumenta considerablemente durante el desarrollo de esta. Sin embargo, **Thomas et al. (1979)**, señalan que el efecto de alojar machos y hembras juntos no afecta la edad de aparición de la pubertad.

También se puede alojar a los verracos de forma individual, siempre y cuando mantengan contacto físico, olfatorio y visual con otros animales, ya que el aislamiento o la restricción social pueden causar comportamientos anormales, agresividad o retraso en la

presentación de la pubertad (**Hughes y Varley, 1984; Manteca et al., 2002; Willenburg et al., 2003; Ferreira et al., 2005; Zamaratskaia et al., 2005**).

La nutrición es un factor importante que puede modificar la aparición de la pubertad. Se sabe que el consumo inadecuado de nutrientes durante la fase de crecimiento puede retrasar la aparición de la pubertad y la maduración sexual, debido a que se afecta el desarrollo de los testículos, hay menor número de CLy disminución de la producción hormonal, encontrándose animales con degeneración testicular y por tanto, alteración en la espermatogénesis (**Lunstra et al., 1986; Riopérez, 1991; Louis et al., 1994; Lewis y Lee, 2001; At-taras et al., 2006; García y De Loera, 2007**).

Debido a que la pubertades un proceso multifactorial, involucra una serie de factores que pueden contribuir al desarrollo y presentación de esta etapa en los machos. Sin embargo, la relación entre los eventos endocrinos y conductual es asociados con la pubertad, no ha sido suficientemente investigada (**Zamaratskaia et al., 2005**).

2.12. Madurez Sexual en el Verraco

La madurez sexual en el verraco, se puede definir como la etapa durante la cual el animal presenta un comportamiento normal de apareamiento (**libido**), habilidad para copular y capacidad de producir espermatozoides fértiles. Esta se produce en una edad variable dependiendo de la raza, nutrición, condiciones ambientales y sociales (**Oskam et al., 2008; Kumaresan et al., 2011**).

La testosterona (**T**) es absolutamente esencial para el inicio de la madurez. Los niveles de testosterona periférica han sido bien correlacionados con el desarrollo testicular, pubertad, madurez sexual y producción de espermatozoides. La disminución del comportamiento sexual está relacionada con la reducción de los niveles de testosterona. Por ello, esta hormona es fundamental para imprimir en los machos la conducta y características morfológicas reproductivas (**Hull y Rodríguez-Manzo, 2009; Oskam et al., 2010; Kumaresan et al., 2011**).

Estudiar el crecimiento de los testículos, valoración del espermiograma y nivel de testosterona durante el período de la pubertad no sólo ayudan en la comprensión de la fisiología reproductiva de los machos sino que sirven de base para nuevos estudios a nivel molecular que permitan identificar los genes responsables de la madurez sexual. Entre los métodos más utilizados para evaluar la maduración sexual en verracos jóvenes,

están el tamaño y peso de los testículos, así como las glándulas bulbouretrales (**Sellier et al., 2000; Oskam et al., 2008; Kumaresan et al., 2011**).

El peso de los testículos aumenta de manera drástica entre el cuarto y sexto mes de vida, alcanzando a los ocho meses su tamaño final. Aunque algunos verracos utilizados para la reproducción son fértiles alrededor de los seis meses de edad, la maduración testicular se puede prolongar hasta aproximadamente 1.5 años de edad. Diversas investigaciones han puesto de manifiesto que verracos que alcanzan la pubertad y por consiguiente la maduración sexual antes que sus contemporáneos tienen una mayor probabilidad de producir más lechones en su vida productiva. Esta observación es de gran importancia en programas de cría de cerdos que utilizan la Inseminación Artificial (IA) como técnica reproductiva. Por lo tanto, se requieren más investigaciones a este respecto para valorar si estas características se puedan considerar como un beneficio y ser utilizadas correctamente en la mejora de la producción (**Kuster y Althouse, 2006; Oskam et al., 2008; Gbore, 2009; Oskam et al., 2010; Kumaresan et al., 2011**).

2.12.1. Valoración Morfométrica de los Machos- Índices Corporales

Distintos factores pueden estar involucrados en la eficiencia reproductiva de los cerdos, dentro de estos se puede señalar la estimación de los índices genéticos, especialmente los parámetros reproductivos, los cuales son limitados en los machos (**Toelle et al., 1984**). Se ha observado que existe una correlación genética positiva ($r=0,50$) entre la ganancia de peso media diaria (**GMD**) y el tamaño de los testículos, cuando el último rasgo se mide a una edad constante, mientras que los resultados disponibles son opuestos cuando el tamaño de los testículos se miden a un peso constante. En cuanto a la relación genética del tamaño de los testículos con espesor de grasa dorsal (**EGD**), hay estudios en los cuales se ha demostrado una correlación negativa moderada entre los dos rasgos (**Toelle et al., 1984**). No obstante, las características físicas del tamaño testicular y espesor de la grasa dorsal (**EGD**) tienen correlaciones genéticas bajas.

Las estimaciones de la heredabilidad (h^2) de los rasgos masculinos son mucho menores que para los rasgos femeninos. No obstante se pueden evaluar, puesto que los valores de h^2 de estas características pueden considerarse de moderados a elevados por lo que serían excelentes valoraciones en los programas de selección esperando obtener resultados fáciles en la elección de los mejores sementales (**Flowers, 2008; Bidanel, 2011**).

Por ello, la h^2 de las características físicas corporales puede ser una herramienta útil para estimar la edad a la que los animales destinados a la reproducción llegan a la madurez sexual. Tanto edad, libido, producción de testosterona, crecimiento testicular, calidad y motilidad espermática, son consideradas dentro de las pruebas de selección y potencial reproductivo, realizando una presión de selección que permite asumir valores de precisión altos sobre aquellos animales que mejoraran las características reproductivas. Tales características como edad a la pubertad y la libido presentan una h^2 estimada de 0,35% y 0,15% respectivamente, mientras que la producción de testosterona responde a la presión de selección y su h^2 es similar a otras características reproductivas masculinas (Katz, 2007; Flowers, 2008).

Estas podrían ser una herramienta útil para medir la madurez sexual de los animales en relación con el desarrollo de los testículos y con ello hacer estimaciones de los parámetros genéticos para con ello valorar las medidas biométricas (características testiculares) ya que en los cerdos, los reportes de estas medidas son escasos (Bidanel, 2011).

Otras valoraciones pueden ser medidas directamente sobre las gónadas, las cuales crecen durante la pubertad como manifestación fisiológica de los cambios durante el crecimiento de los túbulos seminíferos, como indicativos del inicio de la espermatogénesis y factibles de ser considerados como predictivos del futuro reproductivo del verraco. Por otra parte, el desarrollo testicular en esta especie en particular, puede variar entre razas y es sinónimo de los procesos endocrinos y fisiológicos que están ocurriendo internamente así como el grado de crecimiento y maduración testicular van a depender del grado de participación de estos procesos fisiológicos. Antes, y una vez iniciada la esteroidogénesis, espermatogénesis y establecida la pubertad, el desarrollo testicular estará en relación al crecimiento en longitud y diámetro de los túbulos seminíferos, que varían con la edad y raza. En el cerdo, la espermatogénesis ha sido descrita y calculada en 25-26 días con una duración del transporte epididimario de los 10 a 12 días. En este sentido, la producción espermática estará en función de la capacidad y espacio disponible proporcionado por el desarrollo testicular (Fuentes *et al.*, 1995).

La maduración sexual del verraco, por tanto, parece estar asociada de manera diferente con la tasa de crecimiento en función de si se evalúa a edad constante o al peso constante. Existen algunas valoraciones del aparato reproductor de los machos, que permiten predecir el desempeño reproductivo de los mismos, estas estimaciones están

enfocadas en cambios cuantitativos de los componentes testiculares en diversas condiciones fisiológicas o en su caso patológicas. Cada una de estas valoraciones genera datos a partir de estos estudios morfométricos, los cuales están correlacionados positivamente con las funciones testiculares (**Chidozie et al., 2010**), un ejemplo de ello es el tamaño testicular, los índices corporales como la estimación del Índice Gonadosomático (IG) (**Costa et al., 2010; Macedo, 2011**), Índice de Células de Sertoli (ICS) (**de Barros et al., 2007**), así como el Índice Leydigosomático (IL) (**Almeida et al., 2002; Costa et al., 2007**), las cuales tienen una correlación positiva que favorecería la selección de mejores sementales.

Por lo que, el peso gonadal supone estar relacionado a los procesos fisiológicos que con llevan a la reproducción y supervivencia, los cuales al igual que en cualquier otro organismo, están influidos por el ambiente, la calidad y disponibilidad de alimento, temperatura, fotoperiodo, etc., parámetros que deben ser considerados para establecer los índices respectivos por especie, sexo, edad, etc. Una de estas variables es el tamaño testicular el cual ha sido con mucho, el más estudiado por motivos genéticos.

Para la obtención de una medida adecuada de la valoración biométrica testicular se deben de incluir variables como son el peso, volumen, largo y ancho de los testículos, la circunferencia del escroto mismas que varían con la raza, la temporada, la edad y el peso corporal, entre otros factores (**Bruveris et al., 2013; Guimarães et al., 2013**).

Como apoyo a estas valoraciones testiculares, se ha establecido que la evaluación del potencial reproductivo puede ser medida con el **Índice gonadosomático (IGS)**, el cual expresa la relación existente entre el peso total de la masa corporal y el peso testicular (crecimiento testicular y el crecimiento corporal), lo que representa el porcentaje de masa corporal asignado en los testículos, mismo que se obtiene con la fórmula:

$$\text{IGS} = \text{PG} / \text{PC} \times 100$$

Donde, **PG** representa = Peso de las gónadas o testículos

PC = Peso corporal del animal.

Dicha proporción varía entre las especies, por lo que diferentes teorías tratan de explicar por qué algunas especies asignan un mayor porcentaje de masa corporal en los testículos que otras (**Murta et al., 2013**).

En el caso de los cerdos, algunos reportes señalan que la valoración del **IGS** se ve influenciada por la raza, revelando que en comparación con los cerdos domésticos el **IGS** de los cerdos salvajes es aproximadamente un 30% menor, un ejemplo de ello son los cerdos de raza Piau, los cuales presentan un **IGS** de 0,39%; Yorkshire 0,36%; mestizos Landrace x Large White 0,37%; cerdo africano 0,39%; Mini pig chinos 0,25% (**França y Cardoso, 1998; França et al., 2005; Yuan et al., 2012**), mientras que en el caso de cerdos criollos, salvajes y otros suidos se reportan índices de 0,11%-0,14% en capibaras; 0,21% pecarí de collar; 0,16% jabalís y cerdos salvajes (**Moreira et al., 1997; Rego de Paula et al., 2002; Almeida et al., 2006; Costa et al., 2010; Murta et al., 2013**).

Entre los conocimientos básicos, la cuantificación histológica del testículo y sus correlaciones corporales es un requisito importante, además de la cuantificación y la descripción del compartimento intertubular. El principal elemento cuantitativo en este compartimiento y con gran importancia funcional es la **CL**, una vez que actúan en la producción de andrógeno, especialmente la testosterona. Esto debido a que esta hormona lleva a cabo una participación fundamental en la fisiología gametogénica, además de ser indispensable en la modulación de las características sexuales accesorias y del comportamiento masculino (**Campos, 2009**).

2.13. Comportamiento Sexual

El comportamiento es uno de los indicadores más importantes del bienestar de un individuo y se refleja en la respuesta inmediata a la interacción entre el animal y su entorno (adaptación). Por lo tanto, el desarrollo del comportamiento sexual no sólo implica cambios neuroendocrinos durante la pubertad, sino también adaptaciones psicológicas y sociales que se producen antes y después de la misma (**Pfaus et al., 2001; Miranda-de la Lama y Mattiello, 2010**).

El comportamiento sexual del macho consiste en una secuencia compleja de respuestas somato-motrices y gonadales, controladas, dirigidas y gestionadas por señales quimiosensoriales endógenas (producción hormonal) y exógenas (medio ambiente, nutrición). La capacidad de un animal para responder apropiadamente a los estímulos sexuales tiene también una base hereditaria, la cual responde a la habilidad de aprender y reaccionar a los estímulos que preceden al éxito o fracaso reproductivo (**Pfaus et al., 2001; Pfaus et al., 2003; Hemsworth y Tilbrook, 2007; Hull y Rodríguez-Manzo, 2009**).

Dado que los patrones de conducta sexual se desarrollan durante la fase de crecimiento, el aumento de la esteroidogénesis parece ser determinante en el futuro comportamiento sexual. En los verracos, se presenta a partir del primer mes de vida (montar a sus compañeros), el contacto físico con otros animales en esta fase es esencial para la expresión de lalíbido. Dicho comportamiento lo realizan con mayor periodicidad durante el segundo mes de vida y va disminuyendo en los animales prepúberes. Durante el desarrollo de la pubertad esta conducta sexual es mucho más marcada. Estos eventos, se deben considerar como un proceso de aprendizaje (**Tonn et al., 1985; Ford, 1990; Ferreira et al., 2005; Flowers, 2005; Lacorn et al., 2009**).

El comportamiento sexual es controlado por un “**circuito neuronal**” que se relaciona con áreas del cerebro como el área preóptica media (**MPOA**) del hipotálamo (entre cinco y siete veces mayor en los machos), responsable de la activación de la conducta (reflejos genitales: erección, motivación sexual, cópula y eyaculación). La activación de este circuito es altamente dependiente de las hormonas gonadales y de la actividad de las aromatasas. La testosterona (**T**) desempeña un papel esencial en el control de la conducta sexual en machos jóvenes, por lo que es necesario alcanzar un umbral de concentración de dicha hormona para mantener el comportamiento. Los efectos estimulantes de la **T** en el comportamiento sexual en verracos adultos se definen como efectos “activacionales”, mientras que durante la diferenciación sexual se denominan como “**organizadores**”. Lesiones en el **MPOA**, pueden bloquear el comportamiento sexual (**Hull et al., 2002; Hull y Domínguez, 2006; Hull et al., 2006; Hemsworth y Tilbrook, 2007; Hull y Domínguez, 2007; Yeh et al., 2008; Estienne et al., 2009; Yeh et al., 2009; Wu, 2009**).

Dentro de las características sexuales secundarias se considera al comportamiento sexual. Los verracos en la pubertad, muestran cambios conductuales que definen su comportamiento (sexual, agresivo), consecuencia de cambios hormonales (Ty **E2 o 17β-estradiol**), al ser totalmente dependientes de los andrógenos. Esto, supone la existencia de un sistema de retroalimentación positiva entre niveles elevados de androsterona y **T** que estimulan el comportamiento de los verracos (**Hughes y Varley, 1980; Ford, 1990; Hafez, 2000; Zamaratskaia et al., 2005; Kuster y Althouse, 2006; Hemsworth y Tilbrook, 2007; Fredriksen et al., 2008; Wu, 2009; Oberlender et al., 2010**).

Son varios, los factores que pueden influir en el comportamiento sexual: genéticos, sociales, estacionalidad, sexuales y psicológicos, así como la alimentación y el entrenamiento. El comportamiento sexual del verraco incluye dos elementos el primero,

es “**la libido**” o también llamada “**motivación sexual**” y el segundo “**el interés o capacidad de monta**” (Everitt, 1990; Manteca *et al.*, 2002; Hemsworth y Tilbrook, 2007; Yeh *et al.*, 2008, 2009).

2.14. Líbido

La libido, puede definirse como la motivación reflejada a través de comportamientos como el cortejo, la decisión de montar a la hembra (potro de monta), incluyendo la exteriorización del pene y el tiempo que tarda el verraco en iniciar la eyaculación. Desde el punto de vista endocrino, la libido es dependiente de la acción de los andrógenos (T) sobre el sistema nervioso central, los cuales son responsables de la aparición y mantenimiento de la libido. Sin embargo, existen datos que señalan que la libido está fuertemente correlacionada con las concentraciones plasmáticas de estrógenos (Kemp y Soede, 2001; Manteca *et al.*, 2002; Estienne *et al.*, 2004; Flowers, 2005; García y De Loera, 2007; Yeh *et al.*, 2008; Estienne *et al.*, 2009; Yeh *et al.*, 2009).

2.14.1. Factores que Influyen sobre la Libido.

En la activación de la libido pueden influir estímulos físicos, auditivos, visuales u olfativos. Sin embargo, factores como la genética, edad, peso, medio ambiente y nutrición son determinantes para el desarrollo de esta característica. La disminución transitoria de la libido o trastornos en el comportamiento sexual pueden tener un origen psicológico, genético, endocrino, ambiental y/o físico, periodos de exposición a temperaturas elevadas (condicionado al peso y condición corporal del animal), tipos de alojamiento, alimentación, aislamiento en el periodo prepúber, frecuencia de uso de los verracos, experiencias desagradables o traumáticas, y problemas locomotores (Chamberlain y Hughes, 1996; Zimmerman y McGargill, 1997; García *et al.*, 2001; Kozink *et al.*, 2002; Manteca *et al.*, 2002; Estienne *et al.*, 2007; Renet *et al.*, 2009).

El comportamiento sexual en los verracos no ha sido tan estudiado como otras características reproductivas (producción de espermatozoides y la bioquímica del semen). Por tanto, se hace difícil poder valorar la intensidad de la libido, debido a que la motivación puede continuar siendo elevada incluso cuando la expresión física no sea evidente a simple vista (Quiles y Hevia, 2004; Levis y Reicks, 2005; Petherick, 2005; Flowers, 2008; Opletal *et al.*, 2008; Oberlender *et al.*, 2010).

Es lógico encontrar diferencias entre verracos seleccionados para la práctica reproductiva ya que algunos serán capaces de mostrar mayor libido que otros. La genética juega un papel importante en la determinación de la libido. Esta característica reproductiva presenta una h^2 del 15%. Además, es considerada como un componente importante para la estimulación de la pubertad en las hembras. Existe una influencia genética en los rasgos que caracterizan el comportamiento reproductivo del cerdo, un componente racial y ambiental que influirá en su expresión. En verracos híbridos, se observa mayor actividad que en animales puros (**Chamberlain y Hughes, 1996; Zimmerman y McGargill, 1997; Poto et al., 2000; Manteca et al., 2002; Price, 2002; Petherick, 2005; Ljungvall et al., 2006; Hemsworth y Tilbrook, 2007; Sonderman y Luebbe, 2008; Špryslet et al., 2010; Rothschild y Ruvinsky, 2011**).

Kuster y Althouse (2006); Hemsworth y Tilbrook (2007); Flowers (2008); Rothschild y Ruvinsky (2011), señalan que verracos jóvenes procedentes de cruces genéticos presentan mayor libido, pueden ser más agresivos y desarrollan tamaños testiculares mayores, teniendo mayor producción espermática y tasas de fecundación más elevadas que verracos de raza pura. Estas diferencias parecen disminuir a medida que los verracos maduran, no estando claro si se elimina por completo en la edad adulta.

Manteca et al. (2002) y Ferreira et al. (2005), recomiendan que los verracos se alojen en grupos. Esto, les permite adquirir experiencia sexual a través del contacto físico y las interacciones sociales durante la fase de crecimiento, contribuyendo a la expresión del comportamiento sexual y estimulando el desarrollo temprano de la libido. **Thomas et al. (1979)**, señalan que verracos criados en grupos (solo machos), presentan libido más alta, que cuando son alojados en grupos mixtos. Se puede presentar el caso de que animales jóvenes alojados individualmente sufran un retraso en la aparición de la pubertad y disminución de la libido. Este trastorno afecta su rendimiento y los animales pueden presentar algunos problemas locomotores en comparación con machos que han sido alojados en grupos (**Kuster y Althouse, 2006; Hemsworth y Tilbrook, 2007**). El alojamiento de los machos cerca de las hembras, activa la producción de hormonas, permitiendo estímulos olfatorios y sensoriales que son importantes para la aparición del comportamiento sexual. La presencia de feromonas producidas por metabolitos de la testosterona como la androstenona (**5-androstenol**), actúan como estimulantes y favorecen la motivación de los verracos que serán sometidos a entrenamiento en el potro de extracción (**Schneider et al., 1998; Willenburg et al., 2003; Kuster y Althouse, 2006**).

El aprendizaje asociativo que se producen durante el crecimiento, pubertad y madurez tiene un efecto directo sobre el éxito reproductivo. Las experiencias pueden mejorar el rendimiento copulatorio, ya que los animales perfeccionan mediante la práctica su capacidad de monta, requisito previo necesario para la posterior penetración y eyaculación (**Woodson, 2002**).

Efectos psicológicos adversos pueden afectar la libido y el comportamiento. Lesiones en el aparato locomotor, en el pene o testículos, puede inhibir la actividad del verraco a causa del dolor. Al seleccionar un verraco también es importante valorar los aplomos para evitar futuros problemas (**Manteca et al., 2002; Hemsworth y Tilbrook, 2007**).

Alteraciones nutricionales como el consumo inadecuado de energía, proteína, minerales, vitaminas, o la presencia de micotoxinas en el alimento, pueden ocasionar retraso en la aparición de la pubertad y la libido.

Dentro de estos factores nutricionales **Kemp y de Hartog, (1989)**, afirman que la administración de piensos con bajas concentraciones de proteína y energía no afectan la libido de los verracos. Sin embargo, señalan que si la administración de este pienso se prolonga en el tiempo, puede disminuir la libido. **Kemp (1991); Close y Roberts (1991)**; En 1998 el NRC señala que las necesidades de energía para realizar la monta es pequeña (aproximadamente 5% del total energético necesario), y que dicho requerimiento no varía si las condiciones físicas y climáticas del animal no están afectadas. En verracos jóvenes las restricciones en el consumo de alimento (disminución de la ganancia de peso), limitarán la ingesta de energía y proteína, afectando con ello las características reproductivas (**Marchesi, 2003**).

En otro trabajo, **Louis et al. (1994)** señalan que el consumo de una dieta con bajo contenido de proteína disminuye los niveles de **17 β -estradiol** en el torrente sanguíneo, afectando con ello la concentración de **T** y **LH**, hormonas importantes en la manifestación de la libido. También encontraron que los animales que consumieron bajos niveles de proteína rehúsan subir al potro y aumenta el intervalo de tiempo en el que inician la eyaculación. Hay reducción de la producción espermática, incrementándose los problemas locomotores y se reduciéndose la longevidad del animal. Piensos altos en proteína y energía mejoran las características de libido, producción espermática y aumenta la concentración de hormonas en plasma (**NRC, 1998; Estienne et al., 2003; Quiles y Hevia-Méndez, 2004; Sala et al., 2007**).

La edad y su relación con el peso corporal, también pueden afectar la libido. El consumo excesivo de alimento puede generar animales gordos, teniendo dificultad para montar el potro, baja libido, debilidad y lesiones en las extremidades (**Louis et al., 1994; Kozink et al., 2002; Quiles y Hevia-Méndez, 2004; García y De Loera, 2007**).

Bertani et al. (2002), señalan que verracos jóvenes con mayor ganancia diaria de peso, presentan mejor libido, sin embargo, tienen dificultades para montar y la producción espermática se ve afectada, reduciéndose su vida sexual, teniendo que ser sustituidos (**Quiles y Hevia-Méndez, 2004**).

Deficiencias de Vitamina E y Selenio (**Se**) pueden afectar el desarrollo testicular (degeneración), disminuyendo el número de **CG**, **CL** y **CS**, afectando la producción hormonal (**Marin-Guzman et al., 1997; Marin-Guzman et al., 2000; Quiles y Hevia-Méndez, 2004**).

Audet et al., (2002), encontraron que la adición de suplementos vitamínicos en el pienso de verracos jóvenes sometidos a diferentes periodos de colección seminal no mostraba efectos negativos sobre las características reproductivas. Por lo que, la adición de vitamina **A**, **D**, **E**, **B₁₂** favorece el desarrollo de estas características. Las deficiencias de vitaminas inducen efectos negativos en los verracos a mediano o largo plazo (**Sala et al., 2007**).

Quiles y Hevia-Méndez (2002); Retana-Márquez et al. (2003), señalan que bajo condiciones de estrés, se puede inhibir la secreción de testosterona, disminuyendo la libido, reduciendo la producción espermática. Para el restablecimiento del mismo, diversos trabajos recomiendan aumentar los aportes de **Zn** en el pienso, ya que este mineral estimula a las **CL** para una mayor secreción hormonal, lo que favorecería el restablecimiento de la libido y la producción seminal (**Hahn y Baker, 1993; Croxford et al., 2011; García-Contreras et al., 2011**). Sin embargo, excesos de **Zn** pueden tener un efecto negativo en los verracos, así como las deficiencias de este mineral han mostrado reducción del tamaño testicular y pérdida de la libido (**Tuormaa, 1995; Underwood y Suttle, 1999; Suttle, 2010**).

La presencia de micotoxinas como la zearalelona en los piensos de verraco puede repercutir en la reproducción de los animales. La zearalelona interrumpe los procesos reproductivos, ya que tiene un efecto estrogénico que limita la acción de la **17 β -estradiol**, cambios degenerativos en testículos, epidídimos y en la espermatogénesis, así como reducción de la libido (**Diezman y Green, 1992**). Verracos jóvenes con un elevado

consumo (>6.000ppm) de estas micotoxinas, presentaron retraso en el inicio de la pubertad, desarrollo testicular, producción de hormonas y disminución de la libido (**Sala et al., 2007**).

Varios estudios han sido realizados para valorar el efecto de la temperatura sobre el comportamiento sexual, señalando que dicho efecto sólo es temporal. Animales que trabajan durante las horas más frescas del día no presentan disminución del comportamiento (**Hemsworth y Tilbrook, 2007**). Se recomienda que verracos jóvenes que inician su entrenamiento sean alojados en instalaciones con ambiente controlado, evitando cambios bruscos de temperatura que perjudican su actividad. Las horas luz también pueden afectar la libido. **Hoagland y Diekman (1982)**; **Lee et al. (1987)**, señalan que verracos expuestos a periodos suplementarios de luz presentan mejor libido que aquellos que sólo estuvieron sometidos a periodos de luz natural. Además, en animales prepúberes, la suplementación de periodos de luz acelera el inicio de la pubertad.

Muchos estudios se han centrado en la endocrinología del macho, para describir el papel de las diferentes hormonas que regulan el desarrollo de la conducta sexual. Estos estudios están enfocados en la caracterización de la influencia de estas hormonas en la expresión de la conducta o para predecir el posible comportamiento sexual de los sementales. Trabajos recientes señalan que la producción de **T** responde a la presión de selección, y que su heredabilidad es similar a otras características reproductivas masculinas (**Katz, 2007**; **Flowers, 2008**).

Diversos investigadores como **Estienne y Harper (2004)**; **Hull et al. (2006)**; **Kuster y Althouse (2006)**; **Estienne et al., (2009)**, señalan que se requiere una concentración circulante y constante de esteroides para el mantenimiento de la libido. En los verracos, como en otros mamíferos, se sabe que la **LH** y **FSH** estimulan la liberación de **T**, y está claro que este esteroide testicular interviene en el mantenimiento de la conducta sexual.

Kemp et al. (1991), observaron que los niveles de **E2** en el plasma sanguíneo de verracos que subieron al maniquí eran cinco veces superior a los que animales que no montaron. **Louis et al. (1994)**, admiten que existe una correlación positiva entre la libido y las concentraciones de **E2** sérico. **Hemsworth y Tilbrook (2007)**, señalan que el mantenimiento de la conducta sexual de un verraco adulto requiere la combinación de estrógenos y andrógenos. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar de

manera sistemática las funciones precisas de estas hormonas en el desarrollo, iniciación y mantenimiento de la conducta sexual (**Flowers, 2005**).

Existen limitaciones técnicas asociadas a la obtención y utilización de las concentraciones de esteroides (**T**) en los programas de selección de sementales. Sin embargo, algunos estudios indican que verracos seleccionados por la característica de tamaño testicular, presentan elevadas concentraciones de **T**. Cabe señalar que las concentraciones de estas hormonas implicadas en los procesos reproductivos varían entre razas. Por otra parte, el tiempo de la recolección seminal, también puede tener gran influencia sobre los niveles plasmáticos de estas hormonas. Debido a ello, el potencial reproductivo de un verraco no se puede predecir únicamente en base a las concentraciones hormonales. La selección de verracos mediante tamaño testicular, podría ser una alternativa más a la hora de seleccionar animales destinados para la **IA** (**Hoagland y Diekman, 1982; Estienne et al., 2003; Flowers, 2005, 2008; Estienne et al., 2009; Oberlender et al., 2010**).

En la actualidad existe una variedad de pruebas para valorar la libido en los machos. No hay un procedimiento estandarizado y detallado para evaluar el comportamiento sexual de verracos utilizados en la **IA**. La mayoría de los trabajos publicados hacen comparaciones entre sistemas de cría (alojados individualmente o en grupo), razas y líneas genéticas, niveles hormonales, factores nutricionales (ganancia de peso, consumo de proteína, energía y minerales), estacionalidad (horas luz, temperatura), inhibiciones psicológicas (lesiones, experiencias desagradables) y el uso de tratamientos hormonales (prostaglandinas **PGF-2 α**) (**Estienne et al., 2003; Levis y Reicks, 2005; Petherick, 2005; Flowers, 2008; Estienne et al., 2009; Oberlender et al., 2010; Rothschild y Ruvinsky, 2011**).

Se han desarrollado sistemas de puntuación y clasificación para valorar la libido. Dichos sistemas se utilizan durante el entrenamiento de los verracos. Estas estrategias de manejo facilitan el adiestramiento de los verracos. Las valoraciones del comportamiento se realizan desde que el animal ingresa en la sala de recogida (**Levis et al., 1997; Estienne y Harper, 2000; Kozink et al., 2002; Renet et al., 2009; De Alba, 2010**).

Durante las sesiones de entrenamiento, el verraco es valorado por el personal responsable de su adiestramiento. Para ello se recurre a la valoración del comportamiento del animal en el lugar de trabajo y frente al maniquí (**Tabla 3, 4, 5, 6**).

Otras características que pueden ser valoradas son el tiempo que emplea en olfatear e investigar la sala de recolección, tiempo de reacción (tiempo transcurrido desde que entra en la sala y hasta que inicia la eyaculación), montas falsas (número de montas sin eyacular), número de veces que expone el pene sin eyacular, duración de la eyaculación, actitud del verraco (agresividad, nerviosismo, miedo), tiempo de la eyaculación (Levis *et al.*, 1997; Estienne y Harper, 2000; De Alba, 2010).

Tabla 3. Elementos del comportamiento sexual que pueden ser valorados

Líbido o motivación sexual:	Interés o capacidad de apareamiento:
Periodo de reacción (momento de exposición)	Frecuencia de monta (Nº de montas durante el tiempo de trabajo)
Momento de monta (tiempo que tarda en intentar la primera monta)	Frecuencia de penetración (Nº de montas con penetración)
Momento de penetración (tiempo que tarda en hacer la primera penetración)	Frecuencia de eyaculación (Nº de eyaculaciones durante el tiempo de trabajo)
Intervalo pos-eyaculatorio	

Fuente: Everitt, 1990; Yeh *et al.*, 2008

Tabla 4. Índice de valoración por puntos de la líbido de verracos en entrenamiento

Puntuación	Evaluación	Características
0	No monta	Falta de interés
1	Inadecuado	Poco interés, no intenta montar (no presenta erección ni exposición del pene).
2	Deficiente	Poco interés, con algunos intentos de monta (puede haber erección pero no eyacula).
3	Normal	Interéssexualmoderado, intentos de monta, puede mostrar erección, sin eyaculación.
4	Muy bueno	Mayor interés en el potro, intentos de monta, erección y en algunos casos eyaculación.
5	Excelente	Interéssexual evidente, con ereccióninmediata y eyaculación.

Fuente: Estienne y Harper, 2000; Kozink *et al.*, 2002; Estienne y Harper, 2004; Estienne *et al.*, 2007; De Alba, 2008; Frydrychová *et al.*, 2011

Tabla 5. Clasificación de la líbido por niveles

Nivel	Descripción
1 (baja)	Falta de interés (potro de monta).
2 (media)	Presenta interés por el potro, aunque se distrae y tarda en montar.
3 (alta)	Interésevidente, monta rápida y eyacula.

Fuente: Levis *et al.*, 1997; Kozink *et al.*, 2002; Renet *et al.*, 2009; De Alba, 2010

Tabla 6. Clasificación del comportamiento durante el eyaculado

Nivel	Clasificación	Descripción
1	Malo	Nervioso, inquieto, mal comportamiento. Tiempo corto de eyaculación
2	Bueno	Buen comportamiento, tiempo de eyaculación medio (3-5 min).
3	Excelente	Excelente comportamiento, monta rápidamente, tiempo de eyaculación más de 5 min.

Fuente: De Alba, 2010

De acuerdo con **Ferreira et al. (2005)**, la utilización de verracos reproductor es está fundamentada en la capacidad del animal para expresar sus características sexual, la libido, montar el potro, así como, la producción de un eyaculado capaz generar buenas tasas defecundación. Por ello, los resultados actuales hacen hincapié en la importancia de la evaluación, selección, entrenamiento y valoración del comportamiento sexual y reproductivo de los verracos. El desarrollo de técnicas que permitan gestionar y optimizar la producción proporcionando a los animales un nivel alto de bienestar requieren mayor conocimiento de los mecanismos de la conducta los cuales deben ser determinados antes de utilizarlos para IA (**Flowers, 2008; Kongsted y Hermansen, 2008; Oberlender et al., 2010**).

2.15. Selección y Manejo del Verraco.

Las técnicas reproductivas tienen como objetivo, aumentar la productividad (número de lechones, cerda/año), y la mejora genética, reduciendo los costes de producción. Para que el macho tenga una actividad reproductiva normal, debemos tener en cuenta tanto la alimentación como el manejo, para que un animal se reproduzca de forma normal (**Martín Rillo, 1996; Fabré, 2011**).

Una buena práctica reproductiva es el resultado de un protocolo adecuado de manejo, el cual permitirá el desarrollo de las habilidades y cualidades del verraco destinado a la IA, incrementando la eficacia reproductiva de los sementales. Dicho manejo incluye aspectos como: instalaciones (bienestar animal), entrenamiento, sanidad y nutrición (**Quiñónez, 2000; Estienne et al., 2003; De Alba, 2005; Audet et al., 2009**).

En los centros de IA (**CIAs**), el comportamiento sexual del verraco es muy importante, ya que es el indicador de la frecuencia de saltos que presentará un verraco joven. Por tanto, si se considera que los verracos representan el 50% del éxito reproductivo de la explotación, se hace necesario un mayor número de pruebas que incluyan la valoración de la libido y la capacidad de monta de los animales (**Chamberlain y Hughes, 1996; Manteca et al., 2002; Estienne et al., 2004; De Alba, 2008; García y De Loera, 2007; Hemsworth y Tilbrook, 2007; Frydrychová et al., 2011**).

Los verracos son seleccionados principalmente por características de crecimiento, conversión alimenticia, rendimiento de la canal y porcentaje de grasa dorsal, considerándose mínimamente las características reproductivas (líbido y calidad seminal). En consecuencia, se realiza una selección limitada en términos de función reproductiva (**Flowers, 2008**). El examen físico del verraco debe realizarse valorando: la condición corporal y conformación, analizando sus movimientos, morfología de las extremidades, distribución de las tetas, y principalmente su comportamiento. Debe observarse el aparato reproductor, tamaño, simetría, y calificarlos de acuerdo a la edad e identificar alteraciones como cojeras, abscesos, irritaciones, etc (**Levis, 1997; Kongsted y Hermansen, 2008; De Alba, 2010**).

Existen datos en la literatura que señalan tasas de eliminación de verracos del 20%, debido a problemas de orden etológico (montar al maniquí, agresividad). Además, se pueden producir situaciones que condicionen la permanencia del verraco en una granja o en **CIAs** como: la aparición de cojeras y problemas locomotores, falta de líbido, semen de baja calidad, presencia de enfermedades, o comportamiento extremadamente agresivo con los operarios (**Estienne, 2001; Serenoet al., 2004; Althouse, 2007**). Por todo lo comentando anteriormente, la eficiencia de un programa de **IA** puede valorarse teniendo en cuenta los siguientes puntos (**De Alba, 2008**):

1. Tiempo empleado en el entrenamiento del verraco.
2. Total de verracos entrenados.
3. Porcentaje de verracos que montan el potro.
4. El número de espermatozoides obtenidos por eyaculado.

2.16. Alojamiento y Área de Entrenamiento

El diseño y mantenimiento de los alojamientos, así como de la zona de entrenamiento y recogida de semen, deben estar diseñados para garantizar el bienestar animal, seguridad del personal, además de facilitar el movimiento y manejo de los animales (**Garcés et al., 1996; Althouse, 2007; Hemsworth y Tilbrook, 2007**).

En la actualidad, en España, el alojamiento de los verracos debe cumplir una serie de requisitos en cuanto a Bienestar Animal, los cuales se establecen en la Normativa Europea, y están contemplados en la **Directiva 2001/88/CE** del Consejo del 23 de octubre de 2001, **Directiva 2001/93/CE** de la Comisión del 9 de noviembre de 2001 y en el **Real Decreto 1135/2002**, del 31 de diciembre. Estas normas son aplicables a todas las

explotaciones desde el pasado 1/01/05. Dichas normas establecen que las verraqueras deben estar ubicadas y construidas de forma que los machos puedan darse la vuelta y además les permita tener contacto audio-visual y olfativo con el resto de sementales. La superficie mínima de la jaula será de 6,0m². Si dicha estructura va a ser utilizada para monta natural, la superficie recomendada para dicho fin, deberá tener 10,0m² como mínimo. Para las jaulas, se recomienda la utilización de tubos verticales galvanizados (con una distancia de 10cm), (**Garces et al., 1996; Domínguez et al., 2009**).

La iluminación recomendada es de 40 lux durante 8 **horas días**⁻¹ y la intensidad de ruido no debe superar los 85 decibelios. El local destinado para los machos debe estar separado de la cerdas, siendo lo más recomendable construirlo independiente a la nave de explotación con lo que conseguiremos un mejor control en relación a la bioseguridad del mismo.

Existen distintos tipos de suelo: *slat* total de fundición, de varilla metálica triangular, de hormigón, o suelo sólido. Todos tienen sus ventajas e inconvenientes. Debemos tener presente la incidencia en cuanto a problemas de aplomos y poco desgaste de pezuñas. Lo mismo sucede con la elección del tipo de cama (paja, serrín, lino) que vayamos a utilizar. Por lo tanto, debemos determinar en primer lugar la genética y el tipo de conformación de semental con el que vamos a trabajar y así establecer el tipo de suelo y cama que mejor se adapte a sus necesidades.

El control ambiental debe proporcionar un óptimo confort a los animales, alteraciones de iluminación, temperatura o humedad, pueden afectar negativamente el comportamiento del verraco y ocasionar un descenso tanto en la producción como en la calidad seminal (**Buxade, 1994; Callejo, 1996; Forcada, 1997; Trujillo, 2002**).

Entre las condiciones ambientales que se pueden considerar como favorables están: temperatura óptima: 20°C con *slat* total y 13°C sobre cama; temperatura máxima: 27°C; 75% de humedad relativa a 25°C; ventilación: 30 m³hora⁻¹, mínimo y entre 150 a 200m³hora⁻¹, máximo en verano; velocidad del aire: menos de 4 m/s en verano y menos de 1,5 m/s en invierno; calefacción: 250w; caudal de los bebederos: 3 l min⁻¹; iluminación natural de buena calidad completada por iluminación artificial hasta un total de 12-14h de luz.

Una vez que ha terminado la cuarentena, se inicia el periodo de adaptación. Los animales deben acostumbrarse al nuevo local, alimentación, operadores y al contacto con otros machos. Dicha adaptación debe tener al menos una duración de tres semanas. Una

vez finalizada esta fase, se procede al entrenamiento de los mismos (**Bishop et al., 1999; Trujillo et al., 2002; Flowers, 2008**).

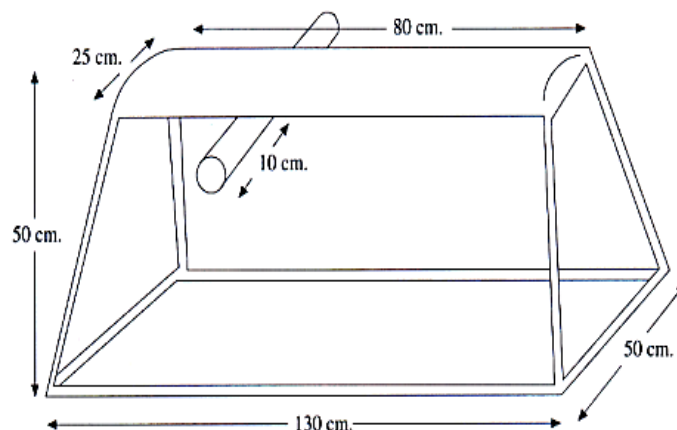
La sala de entrenamiento y colección, debe ser confortable tanto para el animal como para el operario. El lugar debe contar con buena iluminación, no presentar elementos que puedan suponer una distracción para el animal y mantenerse seco (**Estienne y Harper, 2001; Trujillo et al., 2002; Pallás, 2005**). Tanto la seguridad del animal como del entrenador son importantes. Por tanto, se debe disponer de un área de salida que garantice la seguridad del personal en caso de que el animal tome un comportamiento agresivo (**Estienne y Harper, 2001; Levis y Reicks, 2005; De Alba, 2008; Domínguez et al., 2009**).

Se recomienda que la sala de entrenamiento tenga unas dimensiones aproximadamente de 2 x 3 m. El maniquí debe disponerse hacia una esquina de la misma, de tal manera que el verraco, centre toda su atención sobre el maniquí impidiendo que de vueltas sobre el potro. Este hecho puede suceder si el potro se coloca en centro de la sala. El suelo no debe ser resbaladizo y además, se colocan alfombras, tapetes de goma o caucho para evitar que los verracos sufran lesiones en las extremidades (**Bishop et al., 1999; Estienne y Harper, 2001; De Alba, 2005; Domínguez et al., 2009**).

Las medidas recomendadas del potro móvil o fijo se corresponden con una longitud aproximada de 1.00 a 1.50m, ancho 0.25 a 0.35m y una altura promedio de 0.50 a 1.00m, (altura ajustable al tamaño del verraco) siempre debe quedar al nivel de los ojos del macho (**Ilustración 6**).

El maniquí no debe tener bordes afilados que puedan ocasionar lesiones en el verraco o en los operarios, cubierto con, cuero, tela, goma espuma o caucho que aporta mayor higiene y fácil limpieza (**Bishop et al., 1999; Estienne y Harper, 2001; González et al., 2004; De Alba, 2008; Domínguez et al., 2009**).

González et al.(2004), señalan que el entrenamiento del verraco es apropiado realizarlo en su propia verraquera, si el espacio físico disponible es de 7m², y con suelo antideslizante. Sin embargo, **Levis y Reicks (2005)**, recomiendan el uso de una sala de recolección ahorrando tiempo y mejorando en gran medida la seguridad de los técnicos y de los animales.



Por último, el diseño de la sala de recogida puede influir tanto en el tiempo empleado para que un verraco realice el salto como en el tiempo que emplea para regresar a su jaula una vez acabada la sesión. Se recomienda contar con un pasillo de 1m de ancho donde el animal pueda caminar libremente y que permita su manejo sin riesgos (Levis y Reicks, 2005; Althouse, 2007; De Alba, 2008).

2.17. Interacción Verraco - Operario

Una vez realizada la selección del verraco y cumplidos los periodos de cuarentena y adaptación, se puede comenzar el proceso de entrenamiento sobre el potro de recogida.

Debemos tener presente que cuando se entrenan animales es importante tener una estimulación positiva y una recompensa por buen comportamiento. Los animales no siempre se comportan igual frente a un mismo estímulo, ni siempre aguardan un acontecimiento adecuado para desencadenar un comportamiento. La conducta (respuesta) de los cerdos ante los estímulos recibidos por el entrenador puede estar vinculada a la recompensa que recibirán después de haber realizado una actividad, más que como una consecuencia a la interacción que tiene con el entrenador (familiaridad). Por lo tanto, es fundamental que el proceso de entrenamiento se desarrolle correctamente para conseguir el objetivo final (Alcock, 1978; Hemsworth *et al.*, 1996). Dicho entrenamiento deberá realizarse con mucha paciencia por parte de la persona encargada. No se debe olvidar el factor individual de cada verraco ya que varían considerablemente en términos de líbido, producción de semen y en la forma en que responden a un estímulo y un ambiente (García *et al.*, 2001; Flowers, 2008).

La edad del entrenamiento coincide normalmente con la edad de presentación de la pubertad (6-8 meses) (**Martín Rillo, 1996; García et al., 2001; Kuster y Althouse, 2006; Flowers, 2008; Sonderman y Luebbe, 2008; Oberlender et al., 2010**).

Durante el desarrollo del entrenamiento las reacciones del verraco deben ser similares a las que manifestaría frente a una hembra en celo. Este comportamiento está desencadenado por conductas como la identificación o búsqueda, marcaje del territorio (orina), olfateo, vocalizaciones o gruñidos, salivación, golpes en el potro o los flancos (cortejo) y el desarrollo de las habilidades copulatorias: capacidad para montar, exteriorización del pene, penetración y eyaculación. Los reflejos o comportamientos sexuales son innatos y hereditarios, y se manifiestan durante la pubertad. Cada comportamiento puede ser considerado como precursor del siguiente (**Levis et al., 1997; Marotta et al., 1999a; Martín Rillo et al., 2000; Woodson, 2002; Hemsworth y Tilbrook, 2007; Zamaratskaia et al., 2008b; Hull y Rodríguez-Manzo, 2009; Rothschild y Ruvinsky, 2011**).

La inmovilidad de la hembra o en el caso del maniquí, constituye el factor que desencadenará la respuesta sexual del verraco (**Gracia et al., 1999; Martín Rillo et al., 2000**). Las características o pautas de comportamiento que manifiesta el verraco durante el cortejo y que permiten que el macho estimule una respuesta receptiva y detecte un compañero para su potencial apareamiento se pueden describen como:

- **Identificación o búsqueda:** Cuando el verraco se introduce en la zona de entrenamiento, se debe dejar tiempo suficiente para que el animal investigue el lugar, que se sienta seguro y cómodo en el nuevo entorno. Los verracos manifiestan un impulso investigador, que obedece a la necesidad de reconocer, buscar y delimitar territorios. El comportamiento exploratorio está dirigido principalmente a los objetos que encuentra a nivel de suelo, los cuales pueden olfatear, mordisquear y hozar, adquiriendo de este modo, estimulaciones táctiles u olfativas de los elementos que le rodean (**Jen-sen, 2004; Althouse, 2007; Moreno et al., 2009**).
- **Marcar el territorio (orina):** Como parte de la necesidad de delimitar su territorio los verracos pueden orinar en la sala de entrenamiento impregnado de olor el lugar de trabajo, lo cual permite una mayor estimulación (líbido: liberación de feromonas) (**Manteca et al., 2002; Hull y Rodríguez-Manzo, 2009**).

- **Vocalizaciones o gruñidos:** Los verracos exhiben una serie de gruñidos o vocalizaciones breves de baja frecuencia, acompañados de chasqueo de mandíbula y producción de saliva, los cuales están relacionados con la excitación y son eventos importantes durante el cortejo de la cerda en celo (**Hull y Rodríguez-Manzo, 2009; Ren et al., 2009**).
- **Salivación:** Animales sexualmente excitados manifiestan una serie de masticaciones provocando la producción de saliva espumosa que contiene feromonas que estimulan la receptividad sexual. Los componentes de esta saliva principalmente son los metabolitos **3 α -androstanol** y **5 α -androsteno** (**Manteca et al., 2002; Willenburg et al., 2003; Kuster y Althouse, 2006; Ren et al., 2009**).
- **Olfateo:** Los estímulos olfativos del verraco, inducen la respuesta de lordosis en la hembra en celo. El olor sexual generado por los machos se debe a la producción de esteroides, que se generan en los testículos y son liberados por las glándulas sudoríparas, orina, secreciones prepuciales, tejido adiposo y saliva. Exploración y olfateo de la región ano-genital de la hembra en celo o del maniquí (**Manteca et al., 2002; Aguilera-Reyes et al., 2006; Hemsworth y Tilbrook, 2007; Zamaratskaia et al., 2008b; Hull y Rodríguez-Manzo, 2009; Ren et al., 2009**).
- **Golpes en el potro o los flancos (cortejo):** Como parte del cortejo los verracos realizan movimientos y golpes, acompañados de mordisqueo en los costados del maniquí. Además pueden frotarse el cuerpo a la altura de la paleta, contra postes, barras, potro de monta; o rascarse los laterales del cuerpo con las extremidades posteriores (**Lagrecia et al., 1999a; Zamaratskaia et al., 2008b; Hull y Rodríguez-Manzo, 2009; Ren et al., 2009**).
- **Intentos de monta:** Este comportamiento lo manifiestan desde la etapa de crecimiento (durante el primer mes de vida). Estos primeros intentos de monta tienen un efecto marcado sobre su conducta posterior, ya que si experimentan sensaciones desagradables, de dolor o miedo, puede haber disminución de la libido (**Manteca et al., 2002**).

El operario debe conocer estos comportamientos y dominar la psicología del verraco (manifestaciones de orden sexual). El comportamiento copulatorio de los machos tiene características esenciales y específicas (**Cole y Cupps, 1984; Sereno et al., 2004**), presentando una serie de reacciones que incluyen:

- » **Capacidad para montar:** Casi todos los mamíferos machos montan a la hembra dorsalmente por la parte posterior, con lo que sus patas delanteras quedan en

reposo sobre el dorso de la hembra y las posteriores sobre el suelo. El macho inicia con unos movimientos pélvicos anteroposteriores, si el macho no presenta una erección puede renunciar a la postura tomada sobre la hembra (**Serenó et al., 2004; Hemsworth y Tilbrook, 2007; Zamaratskaia et al., 2008b; Hull y Rodríguez-Manzo, 2009**).

- » **Exteriorización del pene y erección:** Causada por el aumento de la presión e irrigación sanguínea, lo cual confiere rigidez al pene, esta ocurre normalmente después de que el animal ha realizado la monta del maniquí y se mantiene en esa posición. Algunos verracos presentan dificultad para exteriorizar el pene, ya que de alguna manera no obtienen suficiente estimulación (respuestas hormonales) para obtener una erección completa (**Hafez, 2000; Althouse, 2007**).
- » **Penetración:** La penetración considerada como el evento que define la cópula, se refiere a la intromisión del pene por vía intravaginal. El macho monta a la hembra realizando el movimiento pélvico apareciendo de repente un empuje más profundo coincidiendo con la penetración vaginal (contracciones rítmicas de los músculos perineales estriados del esqueleto) acompañando a la eyaculación donde el macho se queda en una postura de inmovilidad (asociado al orgasmo masculino) seguido del retroceso y descenso de la hembra. Durante la eyaculación, el macho puede emitir sonidos y producir salivación a la vez que chasquea (**Hull y Rodríguez-Manzo, 2009**).
- » **Eyaculación:** La erección y la eyaculación están controladas por el sistema nervioso autónomo. La eyaculación inicia por contracciones rítmicas de los músculos lisos que recubren la cola del epidídimo y conductos deferentes. El verraco permanece quieto y solo presenta ligeras contracciones rítmicas del escroto, después de las contracciones iniciales el verraco se instalará sobre el potro de monta presentando periodos cortos de inmovilidad seguidos por empujones a intervalos regulares e iniciara a eyacular (tres fases). Después el macho desmonta y retrae el pene con rapidez hacia el prepucio (**Hafez, 2000; Serenó et al., 2004; Kuster y Althouse, 2006; Hemsworth y Tilbrook, 2007**).

Durante el comportamiento copulatorio, la motivación es una condición necesaria pero no siempre suficiente. Un bloqueo de la síntesis local de estradiol conduce a la disminución de esta conducta. El área del cerebro que controla la conducta, es el área preóptica, la cual tiene una alta actividad de aromatasas. Lesiones en esta área pueden bloquear el desarrollo normal del comportamiento sexual (**Wu, 2009**).

Para la realización del entrenamiento, el operario debe demostrar una gran paciencia, además de conocer los comportamientos normales del verraco (actitud, conducta, sonidos), para que el animal acepte la presencia e interactúe con el entrenador. La paciencia es indispensable al iniciar el entrenamiento de animales jóvenes para que realicen la monta y eyaculen. El alojar al nuevo verraco en una zona cercana al área de trabajo, resulta útil para la estimulación de los mismos (**García et al., 2001; Althouse, 2007**).

La interacción entrenador-verraco es importante en el condicionamiento y la respuesta para la monta. Los cerdos no son solamente sociales hacia sus congéneres, sino también a la interacción con las personas. La motivación que ejerza el entrenador hacia el verraco es importante, ya que los animales reaccionan favorablemente a los estímulos positivos que reciben acercándose o interactuando con las personas. Un comportamiento o estímulo negativo de la persona hacia el cerdo, disminuirá la motivación y el interés del animal por trabajar. Por ello, es importante el trato del entrenador hacia los animales (**Manteca et al., 2002; Terlouw y Porcher, 2005; Kuster y Althouse, 2006**).

Diversos trabajos ponen en evidencia que el crecimiento y comportamiento reproductivo de los cerdos, puede estar condicionado (deprimido) en situaciones en las que los cerdos evaden el contacto con las personas. Las interacciones entre el entrenador y el animal, inducen un comportamiento familiar con otras personas. El grado en el que el animal se habitúa a la presencia del entrenador y las propiedades de estímulo (recompensa) y aversión (entrenador asociado a un evento de castigo o lesión) permiten un trabajo de salto y extracción más eficiente. Está bien establecido que los animales aprenden a evitar estímulos condicionados que asocian con agresiones/eventos contrarios (golpes) (**Hemsworth et al., 1996**).

Los animales pueden reflejar frustración mediante comportamientos como: Colocar el hocico en contacto con el suelo, intentar morder al entrenador o el potro. Estas situaciones se producen cuando los animales son incapaces de expresar su comportamiento debido a algún obstáculo físico o psicológico como: no poder mantenerse en el potro, altura inapropiada del potro, resbalones, ruidos, golpes, miedo al contacto con las personas (**Terlouw y Porcher, 2005**).

El entrenador puede interactuar con el verraco y estimularlo imitando los movimientos de la hembra (potro), ysi las circunstancias lo requieren puede imitar el gruñido de la cerda. También se puede recurrir a la comunicación verbal para llamar su

atención y proporcionarle confianza y tranquilidad. Los estímulos como masajes prepuciales y escrotales son indispensables para motivar al verraco, sin embargo, estímulos negativos como patadas, golpes con la mano o algún objeto, gritos, empujones o movimientos rápidos condicionarán la actitud de los animales generando una respuesta de miedo o agresividad hacia las personas que participen en su manejo. Por ello, es fundamental que los animales asocien experiencias gratificantes con el entrenador, lo cual resultara evidente en el comportamiento de los animales interactuando mejor con el personal (**Hemsworth et al., 1996**). Incluso, hay ocasiones donde el estado emocional del verraco puede llegar a ser negativo, si la persona encargada de entrenarlos no está presente en la sala de extracción (**Bishop et al., 1999**).

Los cambios inducidos por el aprendizaje durante la capacitación de monta y eyaculación deben interpretarse para identificar el gusto y capacidad de cada animal. A medida que aumenta la experiencia, dependiente de la libido o motivación sexual el operario debe mantener o modificar (tiempo) el contacto con el animal, siempre priorizando la actitud dócil y de gusto que el verraco demuestre. El aprendizaje sexual se puede definir como un cambio duradero en el comportamiento después de cualquier experiencia social o sexual durante el desarrollo o en la edad adulta. Estos efectos del aprendizaje sexual pueden manifestar alteraciones en la frecuencia, duración y latencia para inicial o terminar el comportamiento sexual. Dichos efectos también se verán afectados por la edad, ambiente, raza, sexo y/o especie (**Woodson, 2002; Hull y Rodríguez-Manzo, 2009**).

La experiencia juega un papel importante en el desarrollo y eficiencia de la conducta sexual. El aprendizaje reducirá el tiempo para iniciar el contacto sexual y lograr la eyaculación, así como la cantidad de estímulos necesarios para iniciarla. Sin embargo, se pueden presentar situaciones de conducta contrarias como: impasibilidad, miedo, agresividad, conductas no siempre fáciles de modificar o corregir (**Manteca et al., 2002; Hull y Rodríguez-Manzo, 2009**).

2.18. Entrenamiento para Inseminación Artificial (IA).

El tiempo de entrenamiento para verracos jóvenes está comprendido entre 15 a 20min, mañana y tarde (**Martín Rillo, 1999**). Se ha comprobado que con tiempos superiores, los animales pierden totalmente el interés por el potro y supone riesgo de cansar al macho y que su comportamiento se torne agresivo o simplemente no responda

frente al maniquí (**Gonzalez et al., 2004; Serenoet al., 2004**), aunque **García et al. (1994)**, señalan que dejar a un verraco sin completar la eyaculación durante el primer contacto con el maniquí, produce un aumento en el tiempo de entrenamiento y la probabilidad de desecharlos como sementales. Periodos diarios de entrenamiento deben efectuarse hasta que el verraco se considere listo y realice correctamente la monta y la eyaculación.

Es recomendable dar un descanso de uno o dos días, considerando que el entrenamiento debe realizarlo la misma persona, para evitar interrumpir la adaptación del verraco al proceso, sin embargo. La duración total del entrenamiento no debe ser superior a tres meses no obstante este periodo dependerá de las reglas establecidas y de las necesidades del **CIA**, así como de la experiencia del entrenador y el estado físico y de salud de los animales. Se considerara que un animal está entrenado, cuando monta el maniquí sin la estimulación del entrenador y cuando se obtienen tres eyaculaciones consecutivas. Una vez que el verraco ha saltado sobre el maniquí, lo que resta es habituarlo al trabajo rutinario.

Es recomendable que animales jóvenes se trabajen una vez a la semana para mantenerlos en una buena condición. El ritmo de recolección óptimo dependerá de la edad y de las características individuales del verraco (**García et al., 1999; Estienne y Harper, 2000; García et al, 2001; González et al., 2004; Sereno et al., 2004; Althouse, 2007; De Alba, 2008; Sonderman y Luebbe, 2008**).

Para estimular al verraco, el maniquí puede ser impregnado con secreciones (orina de hembras en celo, semen o saliva de otros machos) para incitar al verraco a acercarse y obtener una respuesta favorable ante el maniquí, de lo contrario no se logrará atraer su interés hacia el potro. Cuando el verraco muestra interés, se acerca poco a poco desde la parte trasera o lateral (durante este tiempo se deben evitar ruidos, movimientos bruscos), para evitar distraer, asustar o sorprender al verraco. Una vez que el verraco ha identificado el maniquí, algunos animales montan con facilidad comenzando a realizar movimientos pélvicos (empujar), mientras que otros necesitan ser dirigidos por el entrenador (**González et al., 2004; Estienne y Harper, 2001; Althouse, 2007; De Alba, 2008**).

La observación de las reacciones de los animales frente al maniquí determinará el tipo de estrategia o técnica que se utilizara para facilitar el entrenamiento del verraco. Si el animal no muestra interés, el entrenador puede estimular suavemente pero con firmeza empujando la cabeza del verraco hacia el potro para incitarlo a que monte. Las caricias

tienen un efecto positivo en los animales, se ha demostrado en algunos estudios que los cerdos son muy sensibles a las interacciones táctiles con el personal que los entrena. Si el animal, no muestra ningún interés por el potro, lo más recomendable es que salga de la sala de colección y se vuelva a intentarlo más tarde. El deseo de montar generalmente se presenta a los diez minutos del entrenamiento (**Hemsworth *et al.*, 1996; Bishop *et al.*, 1999; García *et al.*, 1999; Estienne y Harper, 2000; De Alba, 2008**).

Durante las primeras recogidas, debe tenerse especial cuidado para no causar daño en el pene (roce con el potro o demasiada presión). Cuando el verraco se encuentra sobre el maniquí, se realizarán una serie de masajes en la zona prepucial facilitando la exteriorización del pene, al tiempo que se vacía el divertículo prepucial que contiene restos de orina con una alta carga bacteriana, evitando de esta manera contaminar el eyaculado (**De Alba, 2008**).

Una vez exteriorizado el pene, se sujeta el extremo del mismo con la mano, de tal forma que los dedos queden al borde de la espiral del glande. Se debe agarrar con firmeza aplicando una presión determinada en la glándula, misma que varía con cada animal. Esto permitirá la estimulación total del macho, comenzando la eyaculación (**Bishop *et al.*, 1999; Hafez, 2000; Estienne y Harper, 2001; Martínez, 2006; Althouse, 2007**).

La técnica utilizada para obtener el eyaculado es la denominada “**de la mano enguantada**” descrita por **Hancock y Hovell** en **1959**, siendo este método manual favorable ya que tiene la ventaja de evitar reacciones de inhibición en los verracos, o la producción de eyaculados incompletos por variaciones de temperatura u otros estímulos inhibitorios ocasionados por el uso de una vagina artificial o la electroeyaculación. Una vez recolectado el eyaculado, el semen debe ser protegido de cambios bruscos de temperatura y luz ya que pueden dañar a los espermatozoides, por lo que el eyaculado se debe trasladar inmediatamente al laboratorio para su valoración (**Estienne y Harper, 2001; De Alba, 2008**).

Por último, una vez finalizada la eyaculación, se debe dejar que el animal retire el pene y baje del potro evitando que el verraco adopte conductas aversivas y/o estímulos pos eyaculación que lo fatiguen. Es importante no forzar al verraco ya que si este asocia el entrenamiento como una experiencia negativa, probablemente se negará a subir al potro en próximas sesiones. La duración de la eyaculación (tiempo de reacción y eyaculación) se estima entre los 3 y 20min (**Fraser y Broom, 1997; Bishop *et al.*, 1999;**

Estienne y Harper, 2001; De Alba, 2008; Hull y Rodríguez-Manzo, 2009; Ren *et al.*, 2009; De Alba, 2010).



Imagen 2. Maniquí AUTOMATE® Minitube.
Fuente: Wilson *et al.*, 2006; De Alba, 2012.

Actualmente en los **CIA**s, pueden utilizarse sistemas de extracción automatizada (García-Artiga, 2012) los cuales, permiten realizar un mayor número de saltos por día, aportando además, una mayor comodidad y seguridad para el operario, siendo al mismo tiempo un proceso más higiénico. La recogida tanto por el método tradicional de la “**mano enguantada**”, como con los sistemas automatizados (Imagen RB2), se facilita cuando se dispone de un foso adyacente al sitio de colección. El operario trabajará de pie y manejará al verraco a través de una compuerta (Wilson *et al.*, 2006; Domínguez *et al.*, 2009).

La fertilidad del verraco es el resultado de la suma de tres parámetros principales: libido, capacidad de monta y calidad seminal. La habilidad de montar y producir eyaculados fértiles son importantes a la hora utilizar un verraco. Por tanto, la instauración de protocolos de manejo que permitan acelerar la formación de verracos destinados a la **IA**, mejorará tanto la eficiencia como la productividad de los programas reproductivos. Cualquier problema que afecte a la actividad reproductiva y que no se detecte con suficiente antelación repercutirá negativamente tanto en la productividad del **CIA** como de la granja (Kozink *et al.*, 2002; Estienne y Harper, 2004; Ferreira *et al.*, 2005; Flowers, 2008; De Alba, 2012).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño de la Investigación

El presente estudio se realizó en la granja porcina La Jabonera, ubicada en el municipio de Sanchonuño, provincia de Segovia en la comunidad autónoma de Castilla y León, España. Situada en la meseta norte de la península ibérica, siendo sus coordenadas 41°19'N 4°18'O con una altura media sobre el nivel del mar de 805m.

Para cumplir con los objetivos se dividió la investigación en tres fases experimentales:



Ilustración 7. Diagrama de actividades dividido en fases experimentales de la investigación para la evaluación de cerdos prepúberes no castrados.

3.1.1. Material de Laboratorio

3.1.1.1. Equipos.

Para el desarrollo de los análisis experimentales de la presente investigación se utilizaron los equipos y materiales que se señalan en las **Tablas 7, 8**.

Tabla 7. Equipos utilizados para la realización de la investigación

Equipo	Casa comercial
Agitador de tubos	POBEL
Agitador magnético con temperatura	Dialyzers
Bandejas plásticas 70x40; 30x20 cm	
Bascula móvil con laterales abiertos	Digi-Star 1000 Kg
Bureta digital 25, 50 mL	POBEL
Cajas de poliespán	
Cámara Fotográfica Digital Sight DS-M	Nikon
Campana de extracción	
Canastilla para portaobjetos	
Campana de flujo laminar	
Centrífuga Sorvall RC2-B super speed	Pierce Biotechnology
Cinta métrica	
Crisoles de porcelana 5 cm diámetro	
Desecador de cristal, 40 cm	POBEL
Dispensador Automático programado (Ergonomically Designed Repetitive Dispenser)	
Dosificador Labmax 10, 100 mL	Witeg
Espectrofotómetro de absorción atómica	SpectrAA 220 Varian
Estufa 1-200 °C	Selecta
Estuches de disección	
Frasco lavador tapón de rosca	POBEL
Gradillas para tubos de ensayo 70 x 155 x 155	POBEL
Imanes	POBEL
Lavador automatizado de microplacas Drop. (ELISA)	SEAC-Radim Group
Lector Elisa (espectrofotómetro) automático para microplacas de 8 x 12 pocillos.Sirio S	SEAC-Radim Group
Maniquí portátil	
Maquina selladora, 300 mm	POBEL
Matraz Erlenmeyer 100, 250, 500, 1000 mL	POBEL
Matraz volumétrico 100, 250, 500	POBEL
Micropipetas 5,10,20,100,1000 µL	POBEL
Microscopio óptico campo claro	RML5® Askmania-Germany
Micrótopo de rotación	Marca Leica© modelo JUNG RM 2055®
Mufla	Controller B170 Nabertherm
Nevera 5°C	
Nevera a -20°C	
Ordenador Samsung	
Pera de goma	POBEL
Pinzas para crisoles 30 cm long.	POBEL
Pinzas para vasos 30 cm	POBEL

Pipetas de cristal 1, 2, 5, 10 mL	POBEL
Probeta 50, 100, 250, 500 mL	POBEL
Procesador automático de tejidos	Shandon-Elliot modelo Bench SCE 0400®
Programa ImageJ 1.4.4.	
Tren de tinción	
Unidad formadora de bloques: (dispensadora de parafina, consola térmica y crioconsola)	Miles Scientific©
Vaso de precipitado 100, 250, 500, 1000	POBEL
Vernier	Stainless Hardened
Ultrasonicador digital	

Tabla 8. Material fungible empleado en la investigación

Material	Casa comercial
Aguja para extracción por vacío 25 mm. 8/10 (21G 1)	BD Vacutainer®
Aguja para extracción por vacío 25 mm. 9/10 (20G 1)	BD Vacutainer®
Aguja para extracción por vacío 25 mm. 7/10 (22G 1)	BD Vacutainer®
Bandejas de aluminio para 1, 2, 3 Kg	
Bolsas con cierre de seguridad con bandas blancas	
Botes polietileno	
Cajas térmicas Poliespán	
Camisa dispositivo protector integrado para extracción de sangre 22G 1 1/4"	BD Eclipse™
Cassettes de plástico para histología	McCormick Scientific™
Crotales plásticos	
Cuchillas para micrótopo 4-5 µm	
Eppendorf 0.25, 0.5, 1, 2.5 mL	
Embudos plásticos	
Filtros Albet 150 mm	Filter-Lab
Frasco lavador tapón de rosca	POBEL
Goma antideslizante	POBEL
Guantes anticalóricos	POBEL
Guantes desechables de vinilo	
Guantes de látex natural	Microflex
Hojas de bisturí	
Portaobjetos	VWR Int.
Puntas desechables plásticas 5, 10, 20, 50, 100 y 200 µL	Gilson
Tubos plásticos de 6 mL.	BD Vacutainer®

3.1.1.1.1. Productos Químicos y Soluciones Empleadas en la Investigación.

En la **Tabla 9** se describen los reactivos utilizados para la evaluación de las diferentes pruebas de laboratorio realizadas, las cuales se describen en orden de elaboración.

Tabla 9. Reactivos utilizados en las diferentes pruebas de laboratorio.

Prueba	Casa comercial
Determinación de Zn en tejidos, Plasma Sanguíneo	
Agua desionizada	SETNA
HCl 37%	PANREAC® 131020
Solución patrón 1000 ppm de Zn	PANREAC® 313193
Solución patrón 1000 ppm de Cu	PANREAC® 313178
Solución patrón 1000 ppm de Mg	PANREAC® 313184
Solución patrón 1000 ppm de Mn	PANREAC® 313185
Solución patrón 1000 ppm de Fe	PANREAC® 313182
Solución patrón 1000 ppm de Ca	PANREAC®
Estroncio Nitrato (SrNO_3) ₂	PANREAC® 131310
Acetileno	PRAXAIR
Morfometría testicular	
Formol tamponado	PANREAC® 253572
Pastillas de Parafina sintética	HISTOSEC®, MERCK®
Sustituto de Xilol	CLEAR
Etanol	PANREAC®
Hematoxilina	
Eosina	
DPX	(NUSTAIN®)
Perfiles concentraciones Hormonal	
kit DE1559 Demeditec Testosterone ELISA	DEMEDIATEC Kiel, Germany
Agua destilada	

Cada fase experimental de la investigación tuvo un periodo de evaluación, en el cual se midieron cada una de las variables de interés, de las que se obtuvieron muestras para realizar las determinaciones correspondientes a través de las diferentes técnicas que se describen a continuación.

3.2. Fase Experimental de la investigación “A”. Comportamiento Productivo de los Animales: Período Experimental *in vivo*.

Para la evaluación del comportamiento productivo de los animales se estableció la primera fase experimental, la cual tuvo una duración de 12 semanas. Durante las dos primeras semanas de la presente fase, se realizó la adaptación de los animales, la cual consistió en prepararlos para su trabajo con el operario, alojamiento, manejo y tratamientos. Las variables que se consideraron desde un inicio fueron: consumo de pienso (**CP**), salud de los machos y las variables productivas peso inicial (**PI**), peso final (**PF**), consumo voluntario de pienso (**CVP**), conversión alimenticia (**CA**), crecimiento corporal (**CC**), así como su evaluación morfológica (**EM**) (**Ilustración 8**). Lo anterior con la finalidad de que los animales al iniciar el periodo experimental no mostraran conductas adversas, que pusieran en riesgo el estudio que a continuación se describe.

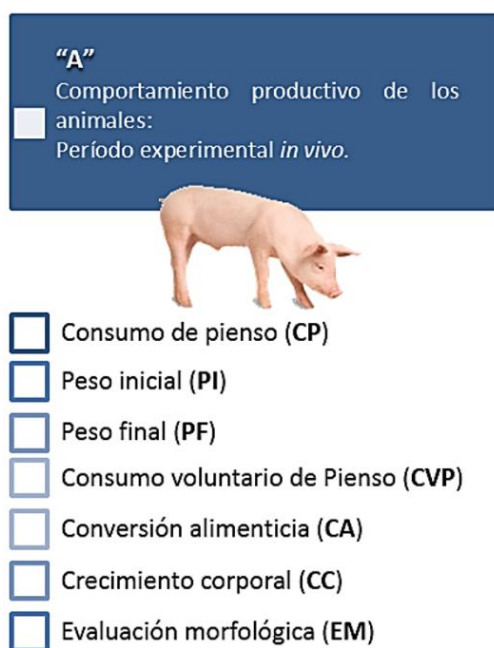


Ilustración 8. Diagrama de actividades fases experimentales de la investigación “A” para la evaluación de cerdos prepúberes no castrados.

Para el desarrollo de la investigación, se seleccionaron 49 cerdos no castrados línea materna con un cruce de razas Landrace x York, peso vivo (**PV**) medio inicial de $35 \pm 1.25 \text{ Kg}$ y una edad media de tres meses. Los animales fueron alojados individualmente de forma aleatoria, en jaulas con suelo enrejillado de cemento, comederos individuales de canaleta y bebederos de chupón individual. La temperatura y

humedad de la nave se mantuvo controlada. Para llevar a cabo la identificación de los cerdos se les colocaron crotales de plástico numerados según el tratamiento.

3.2.1.1. Tratamientos Suministrados a los Cerdos Prepúberes.

Los tratamientos consistieron en fórmulas alimenticias balanceadas por etapa, donde cada etapa fue distribuida de la siguiente manera: En la etapa de crecimiento, desarrollo, y cebo se utilizó un pienso base (**Control**) elaborado con cebada-soja (**Tabla 10**), y balanceado con base a las recomendaciones de **FEDNA (2006)**. El pienso **Control** fue suplementado con tres diferentes fuentes y tres niveles de Zinc (**Zn**), y con ello, se obtuvieron siete tratamientos distintos. El suministro de pienso y agua se efectuó *ad libitum* hasta llegar a la edad de seis meses (120Kg de **PV**).

3.2.2. Asignación de Tratamientos a los Cerdos Prepúberes.

Los tratamientos fueron asignados aleatoriamente a siete cerdos, los cuales se consideraron como unidad experimental (**UE**). Los tratamientos proporcionados se muestran en la **Tabla 11**.

Una vez que fueron asignados los tratamientos, las variables evaluadas en la fase experimental de investigación “**A**” fueron: **PV**; Consumo Voluntario de Alimento (**CVA**); Consumo de Alimento Semanal (**CAS**); **CA**; Ganancia de Peso (**GDP**); y Periodo a 110Kg en días (**D110**). El peso de los animales se obtuvo por semana, en tanto que el alimento fue pesado diariamente para registrar los **CVA**.

Durante este periodo experimental, fueron tomadas muestras sanguíneas de cada animal, las cuales se obtuvieron por punción de la vena yugular, depositando el paquete sanguíneo (5ml) en tubos vacutainer sin anticoagulante. Estas muestras fueron colocadas a una temperatura de 4°C, para su traslado al laboratorio de la Unidad Docente de Zoología (**UDZ**) de la Universidad Complutense de Madrid.

Una vez que las muestras de sangre fueron centrifugadas, el plasma sanguíneo fue colectado y almacenado en tubos ependorff, para su congelación a -20°C, y su posterior análisis. Para el caso de la determinación de testosterona en las muestras de plasma sanguíneo se utilizó el kit **DE1559 Demeditec Testosterone ELISA Kiel, Germany**.

Tabla 10. Valor nutritivo del pienso para cerdos no castrados en crecimiento.¹

Ingredientes	Inclusión	Valor nutricional	Composición	
Cebada	46.2	Peso	100.000	Kg
Maíz	11.562	Humedad	10.465	%
Trigo	10.000	Proteína bruta	17.000	%
Cuartas 9/20	5.000	Grasa bruta	4.974	%
Melaza	2.000	Ac. Linoleico	1.205	%
Soja 44	19.200	Fibra bruta	4.396	%
Fosfato bicálcico		Calcio	0.750	%
	1.045	Sodio	0.177	%
Sal	0.5	Fósforo total	0.579	%
DL- Metionina	0.084	Fósforo Dig. porc.	0.250	%
L-Lisina	0.1	E.Neta por.MCL/K	2.300	%
L-Treonina	0.050	Prot.Dig.Porc.	14.325	%
Vit+Min	0.500	Lis.Dig.Porc.	0.850	%
	100.000	Met.Dig.Porc	0.301	%
		M+C Dig.Porc	0.553	%
		Treo.Dig.Porc.	0.538	%

Incluye (**Kg de pienso**⁻¹): Vitamina A (Trans-acetato de Retinol), 10.000 **UI**; Vitamina D₃ (Colecalciferol), 2.000 **UI**; Vitamina E (Acetato de Tocoferol), 25**mg**; Tiamina (Mononitrato de Tiamina), 0.16**mg**; Riboflavina, 0.781**mg**; Piridoxina (HCl-piridoxina), 0.375**mg**; Vitamina B₁₂ (Cianocobalamina), 4.0**mg**; Vitamina K (Bisulfato de Menadiona), 0.62**mg**; Ácido Nicotínico, 4.0**mg**; Ácido Pantoténico (D-pantotenato de Calcio), 1.9**mg**; Colina (Cloruro de Colina 60%), 21**mg**; Ácido Fólico 50%, 1.25**mg**; Biotina 2%, 1.6**mg**; Mn (MnO 62%), 14.0**mg**; Fe (FeCO₃ 42%), 24.0**mg**; Cu (CuSO₄·5H₂O 25%), 5**mg**; I (KI 75%), 0.33**mg**; Co (Carbonato de Cobalto 52%), 0.36**mg**; Se (Na₂SeO₃ 1%), 2.5**mg**; Carbonato de Ca 0.32**mg**; excipiente, 50**mg**; Antioxidante 2.5**mg**. ¹Contenido de Zn en la pienso base: 25**ppm Kg de pienso**⁻¹.

Tabla 11. Tratamientos aplicados a cerdos prepúberes no castrados, utilizando diferente fuente y nivel de Zn.

Tratamiento	Fuente ²	Nivel de Zn ³ ppm	Fórmula ³
Control	-----	25 ¹	PB
ZnSO ₄ 150	ZnSO ₄ ·H ₂ O	150	PB + ZnSO ₄ ·H ₂ O
ZnSO ₄ 200		200	
ZnO150	ZnO	150	PB + ZnO
ZnO200		200	
ZnMet150	Metionato de Zn	150	PB + Metionato de Zn
ZnMet200		200	

¹Contenido de Zn en el pienso base (PB): Análisis de Espectrofotometría de Absorción Atómica del (AOAC, 2000). ²Todas las fuentes fueron grado alimentario con un contenido comercial de Zn de: 36%, ZnSO₄·H₂O; 72% ZnO; 15% Metionato de Zn. ³Se agregó la fuente de Zn al PB para obtener los niveles (ppm) mostrados en los tratamientos.

**Todos los ingredientes utilizados para la elaboración de los piensos experimentales fueron aportados por el Grupo SETNA nutrición S.A.

Por su parte, la evaluación en vivo del desarrollo de los órganos reproductivos de los machos no castrados, fue realizada semanalmente, evaluando las variables morfométricas testiculares que a continuación se describen: semicircunferencia testicular derecha (**SCTD**); semicircunferencia testicular izquierda (**SCTI**); semicircunferencia testicular total (**SCTT**); longitud testicular derecha (**LTD**); longitud testicular izquierda (**LTI**); todas las medidas incluyeron el escroto y en el caso de la longitud, se incluyó el espacio ocupado por el epidídimo. Las medidas morfométricas de los testículos fueron realizadas según la técnica descrita por Fuentes *et al.* (1989, 1995). Para ello se utilizó

una cinta métrica, colocada de forma horizontal, comprendiendo los dos extremos en donde el escroto se une a la piel en la región perineal (**Imagen 3**).



Imagen 3. Evaluación de las variables morfométricas testiculares.

3.3. Fase Experimental de la Investigación “B”. Evaluación de la Composición Mineral de los Tejidos; Morfometría Testicular y; Concentración Hormonal en Cerdos Prepúberes.

Una vez finalizada la **fase experimental de la investigación “A”** y conseguir que los cerdos alcanzaran un peso aproximado de **120Kg** de **PV**, se seleccionaron aleatoriamente tres cerdos por tratamiento, los cuales fueron sacrificados en un matadero comercial (Matadero Central de Asturias). Colectando diferentes tejidos: Bazo, Hígado, Huesos, Riñón, Páncreas, Testículos y Epidídimos. Dichos tejidos fueron pesados y colocados en cajas térmicas para su conservación a **4°C**, hasta su llegada al laboratorio y su posterior análisis.

En los tejidos testiculares se midieron: Largo testicular (**LT**); Ancho testicular (**AT**); Circunferencia testicular (**CT**); Peso testicular (**PT**) (**Imagen 4**).

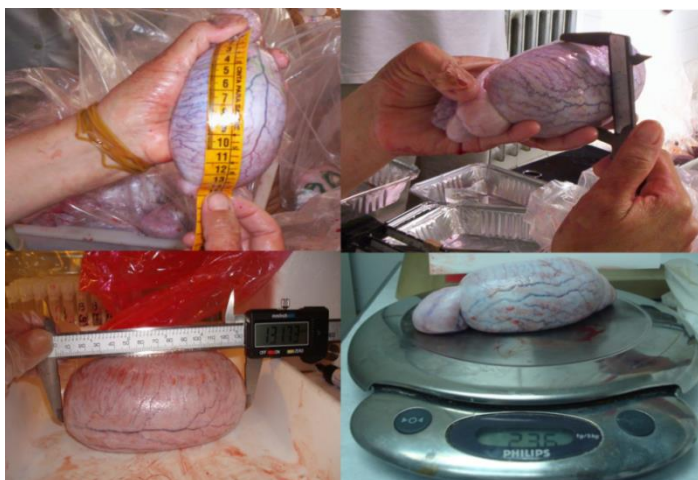


Imagen 4. Evaluación de tejidos testiculares.

3.3.1. Evaluación de la Composición Mineral.

Las muestras de tejidos (bazo, hígado, riñón, páncreas, testículos, epidídimos y hueso: fémur) obtenidas en el matadero, fueron trasladadas al laboratorio de la unidad docente de Zoología de la **UCM**. De cada tejido se determinó la Materia Seca (**MS**), Humedad (**H**) y Ceniza (**Cnz**), así como el contenido mineral (**Zn, Cu, Mg, Mn, Fe**).

Una vez que los tejidos llegaron en cajas térmicas (**4°C**) al laboratorio, se les retiraron las membranas que los cubrían, se pesaron y colocaron en refrigeración a **-20°C** hasta su procesamiento. De cada tejido se tomó una muestra de **200gr**, aunque para el caso del epidídimo se utilizó el órgano completo y fueron sometidos a un proceso de desecación durante **24hrs** a temperatura constante de **100°C**. Transcurrido ese tiempo, los crisoles se transfirieron a un desecador hasta obtener una temperatura constante. Una vez pesados en la balanza analítica se obtuvo la proporción de **MS** y **H**.

La muestra seca de cada tejido, fue molida y homogeneizada. Una cantidad de al menos **5gr** de esas muestras, fue colocada en crisoles de porcelana pesados previamente. Posteriormente los crisoles se llevaron a una mufla programada, en la cual se procedió a la obtención de **Cnz**. La distribución de los tiempos y el aumento de temperatura fueron las siguientes: La temperatura inicial de **120°C** se alcanzó en **30 min**. En el mismo intervalo de tiempo se llegó a **250°C** y a partir de los **60 min** la temperatura se elevó a **550°C**. Esta temperatura se mantuvo por **12hrs**, y nunca fue mayor a los valores antes descritos, para evitar la pérdida de los minerales por procesos de volatilización. Una característica observada en las muestras incineradas, que indicó que estaba lista en los tiempos antes señalados, fue el color blanco o gris suave que

mostraba la muestra al finalizar el proceso de incineración, así como la textura suave y polvosa.

Una vez concluidos los tiempos de incineración, los crisoles se dejaron enfriar hasta alcanzar una temperatura de 90°C a 100°C. A continuación, se colocaron en un desecador de cristal, en donde se mantuvieron hasta llegar a una temperatura constante y sin H.

Los crisoles que contenían la materia incinerada, fueron pesados en una balanza analítica y por diferencia se obtuvo la proporción de **Cnz** de cada muestra. Las muestras de **Cnz**, se almacenaron en botes de polietileno hasta su análisis.

3.3.2. Digestión y Dilución de Muestras para Espectrofotometría de Absorción Atómica.

3.3.2.a Tejidos procesados para determinación mineral.

En un matraces Erlenmeyer de 500mL, fueron depositadas las muestras de **Cnz** correspondientes a cada tejido. Dentro de una campana de extracción, se añadió al matraz 100mL de solución **HCl** 18.5%, cada matraz se calentó en un digestor (baño de arena), colocándolo dentro de la campana de extracción para llevar a cabo la digestión de las **Cnz**. El matraz se introdujo en el digestor, calentándose lentamente hasta alcanzar una temperatura de 350°C. El contenido de **HCl** 18.5% se fue reduciendo por evaporación hasta un volumen de 50mL (**Imagen 5**).



Imagen 5. Digestión de cenizas de tejidos para determinación mineral.

Una vez finalizada la digestión, se retiraron los matraces del baño de arena y se dejaron dentro de la campana de extracción, hasta que enfriaran y cesará la eliminación de vapores. La solución digerida del Bazo, Epidídimo, Hígado, Páncreas, Riñón, Testículo y Huesos, fue filtrada en un matraz volumétrico de 100mL, 250mL o 500mL (dependiendo del tipo de muestra), utilizando un embudo con un filtro Albet para eliminar las partículas que pudieran interferir en las lecturas EAA. El filtrado resultante se diluyó con agua desionizada y se enrasó hasta alcanzar el volumen final para posteriormente ser leídos en el espectrofotómetro de absorción atómica de llama con aire/acetileno (**SpectrAA 220 VARIAN**) (**Imagen 6**).



Imagen 6. Filtrado de muestras digeridas para la determinación de minerales en tejidos.

3.3.2.b Plasma sanguíneo para determinación mineral.

Las muestras de sangre de cada animal fueron colectadas mediante la técnica de punción de la vena yugular en tubos **BD Vacutainer®** de 6mL. Dichas muestras fueron centrifugadas durante 15min a 1000g, una vez realizado este proceso, el sobrenadante fue retirado por aspiración con una pipeta y colocado en otro tubo para su conservación a -20°C hasta su procesamiento.

Una vez descongeladas las muestras de plasma sanguíneo (**PS**) se procedió a la preparación de las mismas para evaluar la concentración de minerales (**Zn, Mg y Ca**) presentes. Para ello, se utilizaron tubos de plástico de 3mL previamente lavados con **HCl**, para eliminar la presencia de residuos que pudieran ser causa de interferencia en los resultados.

En cada tubo, se colocó aproximadamente **1mL** (relación **mL:gr**) de plasma y se pesó una vez más en una balanza analítica para comprobar la cantidad existente. Se agregó agua desionizada al tubo obteniendo una dilución 1:2 y agitando vigorosamente para obtener una solución homogénea. Esta dilución fue utilizada para evaluar la concentración de **Zn**.

Para evaluar la concentración de **Mg** y **Ca**, de igual forma se tomó aproximadamente **1mL:gr** de plasma colocándolo en un matraz volumétrico de **100mL**, el cual fue pesado y tarado previamente. Una vez colocada la muestra de plasma se pesó nuevamente para verificar la cantidad. En el caso de estos minerales se agregó en el matraz **10mL** de **HCl** y **10mL** de una solución de Lantano (para evitar interferencias de otros metales en la lectura) y se agregó agua desionizada hasta aforarlo a **100mL**, diluyendo con ello la muestra de plasma y agitando para homogenizar la solución.

Todas las muestras (tejidos y plasma) fueron procesadas en el laboratorio de análisis y control de calidad de materias primas y piensos del **Grupo SETNA Nutrición S.A.**

3.3.2.c Lectura de Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA).

La evaluación por espectrofotometría de absorción atómica (**EAA**) es una técnica de alta selectividad, sensibilidad y rápida realización. Por ello, en esta investigación se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica con lámpara de deuterio para corrección de fondo y llama de aire-acetileno, calibrado según las instrucciones de operación descritas en la **Tabla 12 (Imagen 7)**.

Como método de control de la técnica se utilizó una solución estándar de cada mineral evaluado, partiendo de una solución patrón, para construir la curva de calibración del equipo.



Imagen 7. Lectura de la concentración de minerales con el Espectrofotómetro de Absorción Atómica (EAA).

Una vez realizada la curva de calibración de cada mineral, la lectura de las muestras diluidas se realizó una a una, colocando el capilar de lectura del espectrofotómetro dentro del matraz.

La concentración de **Zn**, **Cu**, **Mg**, **Mn**, y **Fe**, fue mostrada automáticamente en el ordenador (**Imagen 8**), los resultados obtenidos de dicha medición se expresan en partes por millón (**ppm**) de los minerales contenidos en las **Cnz** de los tejidos evaluados. Asimismo, la concentración en el plasma sanguíneo se expresa en **ppm** de **Zn mL⁻¹**.

Tabla 12. Condiciones de operación del espectrofotómetro para la determinación de minerales.

Variable	Valor				
	Zn	Mg	Mn	Cu	Fe
Longitud de onda (nm)	213.9	202.6	279.5	324.8	248.3
Anchura de rendija (nm)	1.0	1.0	0.2	0.5	0.2
Limite menor de detección (ppm)	>0.01	-	>0.02	>0.01	>0.05
Corriente de lámpara (mA)	5.0	4.0	10.0	10.0	10.0
Integración (S)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Flujo de aire (L/min)	13.5	13.5	13.5	13.5	13.5
Flujo de acetileno (L/min)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00

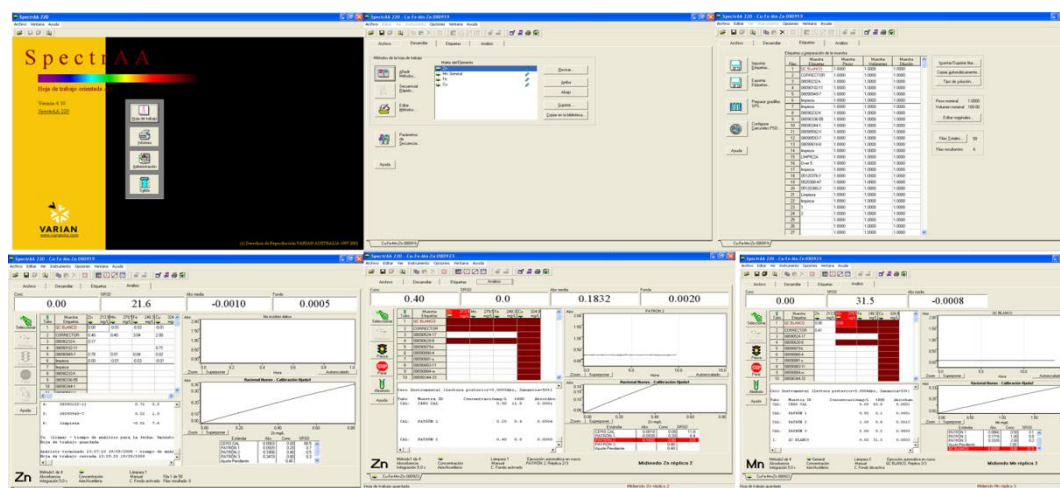


Imagen 8. Lecturas del Espectrofotómetro de Absorción Atómica (EAA).

3.3.3. Perfiles Hormonales de Cerdos Prepúberes.

Para realizar el seguimiento de los perfiles hormonales (concentración de Testosterona) que presentan los animales tratados con diferentes fuentes y niveles de **Zn**, durante el periodo de crecimiento-pubertad, se obtuvieron muestras de sangre. Un total de 314 muestras fueron colectadas (49 animales) mediante la técnica de punción de la vena yugular (técnica antes descrita).



Imagen 9. Preparación de muestras de suero sanguíneo y kit para la determinación de Testosterona de los cerdos prepúberes.

El método empleado para la determinación hormonal en suero sanguíneo fue la técnica de inmunoensayo enzimático (reacción serológica que utiliza conjugados para poder visualizar la reacción *antígeno-anticuerpo*) con un kit comercial (kit DE1559 Demeditec Testosterone ELISA Kiel, Germany) (**Imagen 9**). Para la determinación cuantitativa *in vitro* de testosterona total en plasma, dicha técnica fue realizada en el laboratorio de Producción Porcina del **INIA**, Madrid.

Para asegurar el funcionamiento correcto del test, tanto los reactivos del kit, como las muestras de plasma sanguíneo fueron utilizados a temperatura ambiente. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado colocando en cada pocillo de la placa 25µl de cada solución estándar, de cada muestra y un control.

Una vez colocadas todas muestras por placa (96 pocillos x placa), se realizaron dos periodos de incubación:

- » Primer periodo de incubación, con el conjugado enzimático durante 60min. Pasado este tiempo, se lavaron los pocillos con la solución de lavado (3 veces, 400µL de la solución x pocillo) utilizando un lavador automatizado de microplacas (**Imagen 10**).

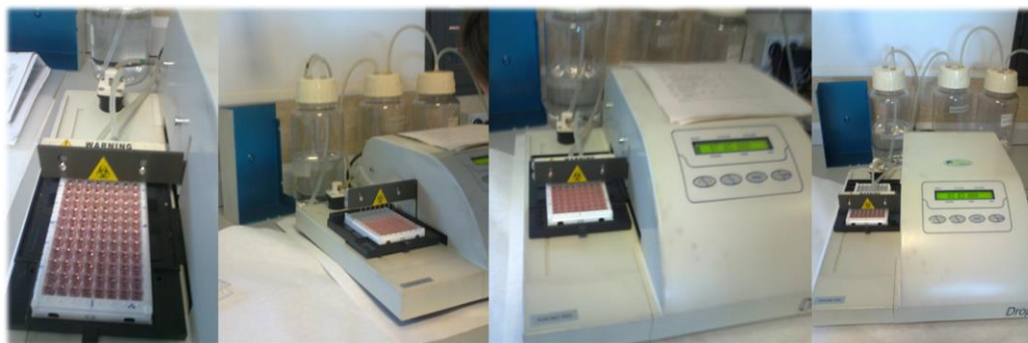


Imagen 10. Incubación de las muestras con el conjugado enzimático y posterior lavado automatizado de microplacas.

- » Posteriormente el segundo periodo de incubación se realizó con la solución de sustrato durante 15min. Ambos periodos de incubación se realizaron a temperatura ambiente y en un lugar oscuro para evitar variaciones de luz que pudieran alterar el resultado.

Tabla 13. Condiciones de operación del espectrofotómetro (lector de microplacas) para la determinación de testosterona por ELISA.

Variable	Valor
Calibrado (nm)	450±10
Curva de Regresión	4 PL (4 Parámetros logísticos)
Sensibilidad analítica del ensayo	0,083 ng / ml

Una vez terminados los periodos de incubación se agregó la solución de *Stop*, para detener la reacción enzimática y realizar la lectura de la placa (dentro de los 10 primeros **min** después de la adición de la solución de *Stop*) (**Imagen 11**). Para la lectura de la densidad óptica se utilizó un lector de microplacas (Lector Elisa automático para microplacas de 8x12 pocillos, Sirio S) (**Tabla 13**).

La concentración de testosterona [**T**] fue calculada por el software del lector de microplacas, estableciendo una curva estándar mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (**Y**) y la concentración en el eje horizontal (**X**). Una vez establecida la curva estándar, se utilizaron los valores de absorbancia media de cada muestra para determinar la concentración de testosterona correspondiente a cada muestra a partir de dicha curva. Los resultados obtenidos se expresan en **ng mL⁻¹** (**Imagen 12**).

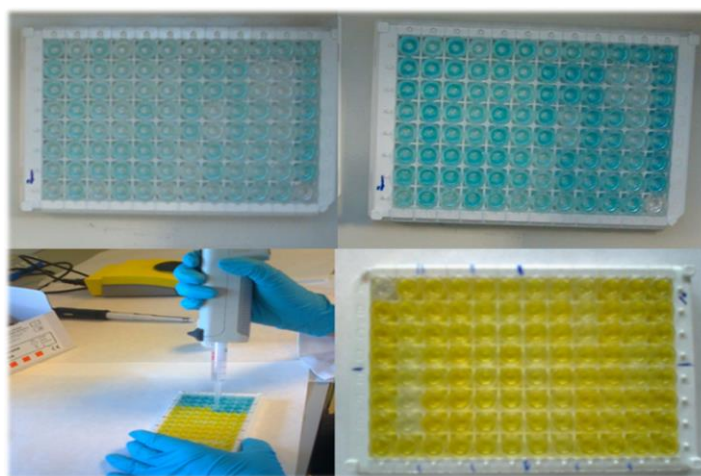


Imagen 11. Segunda Incubación de las muestras, aplicación de solución Stop para detener la reacción enzimática y realizar la lectura de la placa.

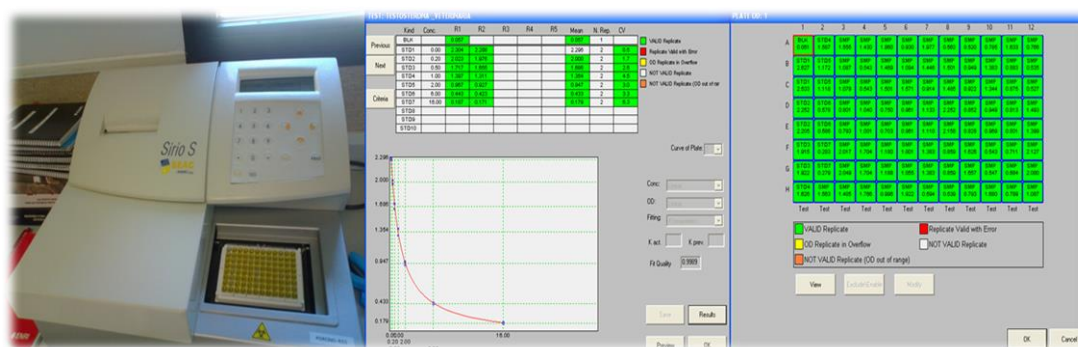


Imagen 12. Lectura de la concentración de Testosterona con el lector de microplacas, obteniendo valores de absorbancia media de cada muestra.

3.3.4. Morfometría del Tejido Testicular de Cerdos Prepúberes

De los 21 cerdos sacrificados durante la fase experimental de la investigación “B”, fueron obtenidos los testículos, mismos que se pesaron y valoraron física y macroscópicamente. Posteriormente se obtuvieron muestras de cada tejido para su análisis histológico y para determinar el desarrollo de las células de Sertoli (**CS**) y células de Leydig (**CL**) en los testículos.

3.3.4.a. Histología testicular.

Para analizar la morfometría testicular, se realizó la identificación y cuantificación del número de **CS**, **CL** y Diámetro de Túbulos Seminíferos (**DTS**) por testículo.

Al sacrificio de cada animal, se obtuvieron los testículos los cuales, se refrigeraron a 4°C para su conservación. Una vez limpios y diseccionados se hicieron cortes de 2 a

3mm aproximadamente del parénquima testicular, siendo colocados para su fijación, en botes que contenían formol tamponado comercial al 10%, (Panreac© ref. 253572 estabilizado con metanol a pH=7) y conservadas a temperatura ambiente (**Imagen 13**).



Imagen 13. Disección de los tejidos testiculares y obtención de muestras para histología.

El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Histología del Hospital Clínico Veterinario de la **UCM**. Para ello, las muestras fijadas en formol se tallaron e introdujeron en cassettes de plástico y fueron lavadas en agua corriente durante 2 a 4hrs. Posteriormente, cada muestra fue incluida en parafina sintética (Histosec® pastillas, Merck© cuyo punto de fusión oscila entre los 56 y 57°C), mediante un procesador automático de tejidos Shandon-Elliot modelo Bench SCE 0400®, con un programa de cambios automáticos de alcoholes de creciente graduación y bencenos. Los bloques se realizaron en una unidad formadora de bloques, (dispensador de parafina, consola térmica y crioconsola de Miles Scientific©). A continuación, se obtuvieron los cortes histológicos de 4-5µm de grosor mediante el uso de dos micrótomos de rotación diferentes, marca Leica© (modelo JUNG RM 2055® y modelo LEICA RM 2155®) (**Imagen 14**).

Los diferentes cortes se trataron con xilol para eliminar la parafina, se hidrataron en una serie decreciente de alcoholes y por último, fueron tratados con agua, para realizar posteriormente la tinción. La técnica utilizada para la tinción fue la rutinaria de Hematoxilina-Eosina. Después, se deshidrataron primero en una serie creciente de alcoholes y xilol y finalmente se montaron con DPX® (Nustain©) para su estudio morfométrico (**Imagen 15**).

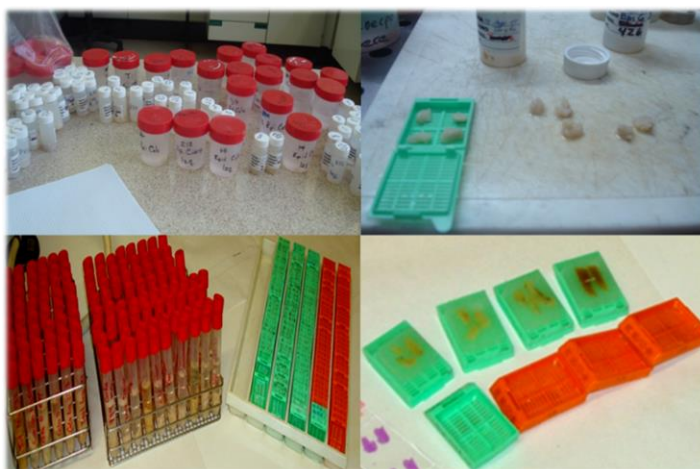


Imagen 14. Muestras de tejido testicular antes y después de ser procesadas en bloques de parafina para realizar los cortes histológicos.



Imagen 15. Obtención de las laminillas con los cortes histológicos de cada testículo.

3.3.4.b. Evaluación de las Muestras Histológicas

Para la evaluación de las muestras histológicas de cada testículo se valoró el **DTS**, **CS** y **CL** por corte de testículo.

En un microscopio óptico de campo claro (RML5® Askmania-Germany) utilizando un aumento de 40 x, se tomaron fotografías (Cámara Nikon Digital Sight DS-M), de diferentes regiones del corte histológico (**Imagen 16**). Una vez obtenidas las fotografías, se procedió a la identificación de estructuras (**DTS**, **CS**, **CL**) para su posterior medición y conteo. De cada fotografía obtenida se identificaron cinco túbulos seminíferos (elección al

azar), realizando la medición del **DTS**, la cual se obtuvo en micras (μm) utilizando el programa **ImageJ 1.44**.

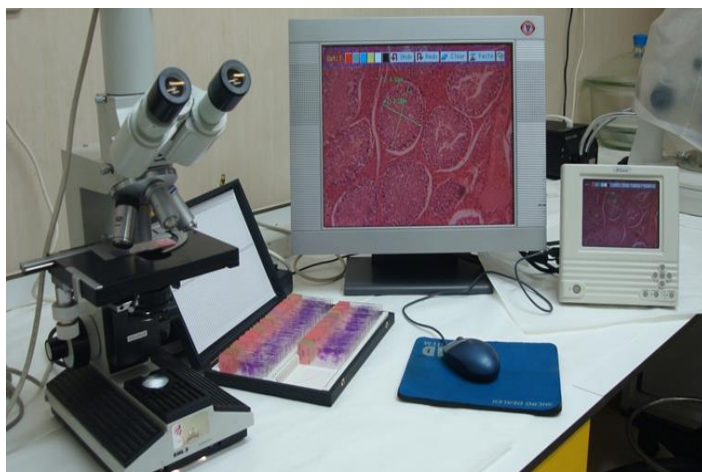


Imagen 16. Evaluación al microscopio de los cortes histológicos testiculares.

Posteriormente, se procedió al conteo del número de **CS**, para lo cual se identificaron por su morfología en el interior de los **TS** dentro de la superficie luminal del epitelio exhibiendo una forma aplanada poligonal filamentosa, que rodea a las células germinales, con un núcleo basal ovoide irregular, citoplasma claro y cilíndrico (**Hai et al., 2014**).

De igual forma, la identificación de las **CL** dentro del espacio intertubular se realizó por sus características morfológicas, es decir su forma esférica y su núcleo de forma triangular y gran tamaño. La pigmentación del núcleo se reconoce por que presenta una coloración violácea debido a la hematoxilina y el citoplasma de la célula se presenta de color rosado a causa de la tinción con eosina.

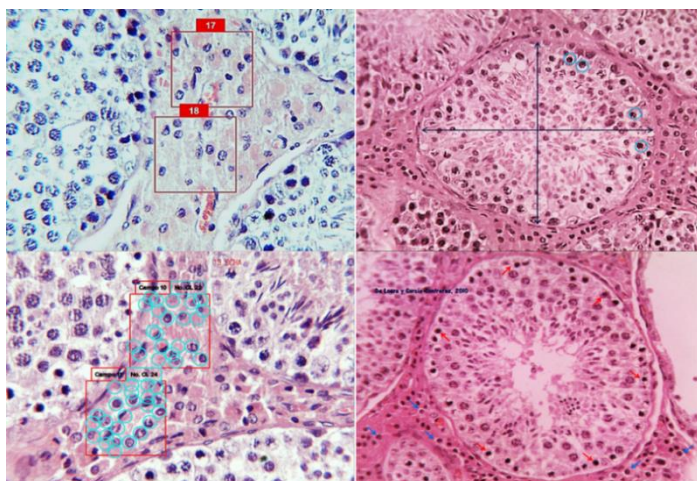


Imagen 17. Identificación y conteo de estructuras (células de Sertoli y Leydig) en los cortes histológicos.

El conteo de las **CL** se realizó seleccionando diez campos con una medida aproximada de (5,8cm²) por preparación histológica. Debido a que en el cerdo las **CL** son mononucleadas, se realizó el conteo del número de núcleos pigmentados presentes por campo, y con ello determinar el total de células presentes por μm^2 (**Imagen 17**).

3.4. Fase Experimental de Investigación “C”. Evaluación del Comportamiento Sexual y Establecimiento del Entrenamiento de los Verracos Jóvenes.

3.4.1. Verracos e Instalaciones.

Se utilizaron 35 verracos jóvenes F1 (Landrace x York), con una edad media de 8.5 meses, los cuales se alojaron en corraletas individuales con bebedero de chupete, y comedero de canaleta dentro de una nave cerrada, con ventilación automática.

Se dispuso de un área de entrenamiento y trabajo para la extracción seminal, la cual fue acondicionada dentro de la misma nave de alojamiento. Se recurrió al uso de un maniquí móvil para la monta y una alfombra antideslizante para facilitar la actividad de los animales. Cada verraco fue considerado como Unidad Experimental (**UE**) y fueron distribuidos aleatoriamente en las corraletas individuales, donde permanecieron hasta finalizar la investigación.

3.4.2. Tratamientos Suministrados a los Verracos Jóvenes.

La alimentación de los verracos jóvenes durante esta fase experimental de la investigación “C”, se realizó tomando como base en cada tratamiento el **PB** (Control) elaborado con cebada-soja (**Tabla 14**) y balanceado con las recomendaciones de **FEDNA (2006)** para verracos en producción. Los tratamientos se suplementaron con las mismas fuentes y niveles de **Zn**, utilizados durante la primera fase de investigación.

El racionamiento del pienso consistió en un suministro individual restringido de 1.8 a 2.5 **Kg día⁻¹**, considerando su condición corporal (**Pond, 1998**), y agua *ad libitum*. El pienso proporcionado a cada cerdo fue pesado diariamente.

Tabla 14. Nivel nutritivo del pienso para verracos en producción¹

Ingredientes	Inclusión	Valor nutricional	Composición	
Cebada	47.25	Peso	100.00	Kg
Maíz	12.56	Humedad	10.47	%
Trigo	10.66	Proteína bruta	17.00	%
Cuartas 9/20	5.0	Grasa bruta	4.98	%
Melaza	2.0	Ac. Linoleico	1.21	%
Soja 44	20.30	Fibra bruta	4.4	%
Fosfato bicálcico	1.07	Calcio	0.75	%
		Sodio	0.18	%
Sal	0.5	Fósforo total	0.16	%
DL- Metionina	0.86	Fósforo Dig. porc.	0.25	%
L-Lisina	0.1	E.Neta por.MCL/K	3400	Kcal Kg ⁻¹
L-Treonina	0.05	Prot.Dig.Porc.	14.33	%
Vit+Min	0.5	Lis.Dig.Porc.	0.85	%
		Met.Dig.Porc	0.30	%
		M+C Dig.Porc	0.55	%
	100.00	Treo.Dig.Porc.	0.54	%

Incluye (**Kg de pienso⁻¹**): Vitamina A (Trans-acetato de Retinol), 10.000 **UI**; Vitamina D₃ (Colecalciferol), 2.000 **UI**; Vitamina E (Acetato de Tocoferol), 25**mg**; Tiamina (Mononitrato de Tiamina), 0.16**mg**; Riboflavina, 0.781**mg**; Piridoxina (HCl-piridoxina), 0.375**mg**; Vitamina B₁₂ (Cianocobalamina), 4.0**mg**; Vitamina K (Bisulfato de Menadiona), 0.62**mg**; Ácido Nicotínico, 4.0**mg**; Ácido Pantoténico (D-pantotenato de Calcio), 1.9**mg**; Colina (Cloruro de Colina 60%), 21**mg**; Ácido Fólico 50%, 1.25**mg**; Biotina 2%, 1.6**mg**; Mn (MnO 62%), 14.0**mg**; Fe (FeCO₃ 42%), 24.0**mg**; Cu (CuSO₄.5H₂O 25%), 5**mg**; I (KI 75%), 0.33**mg**; Co (Carbonato de Cobalto 52%), 0.36**mg**; Se (Na₂SeO₃ 1%), 2.5**mg**. Carbonato de Ca 0.32**mg**; excipiente, 50**mg**, Antioxidante 2.5**mg**. ¹Contenido de **Zn** en la pienso base: 25**ppm Kg de pienso⁻¹**.

3.4.3. Evaluación del Comportamiento Sexual de los Verracos.

Cuando los animales alcanzaron una edad media de 116 días, se efectuó una evaluación del comportamiento sexual de 35 verracos jóvenes, a través de un etograma de trabajo el cual se realizó durante 16 semanas continuas, periodo que correspondió a su entrenamiento y posteriormente a su actividad sexual semanal (colección de semen) (**Tabla 15**).

El periodo de entrenamiento tuvo una duración de cuatro semanas. Este periodo consistió en adaptar al animal a un corral de trabajo, acondicionado con un maniquí móvil y un tapete de goma antideslizante para evitar que el verraco resbalara durante el trabajo. Las condiciones ambientales fueron las mismas para todos los animales.

Para estimular a los animales en el corral de trabajo se procedió a desplazar el maniquí por el corral, esto con la intención de imitar el comportamiento de la cerda en celo, además de estimular al verraco a través de masajes en la zona del prepucio o impregnando el maniquí con fluidos procedentes de hembras en celo o eyaculados de otros verracos. La duración de cada sesión fue de 15min a 20min por animal, repitiendo el proceso de entrenamiento.

Después de las cuatro semanas de entrenamiento, 31 de los 35 verracos ya habían sido entrenados con éxito (es decir, al entrar en el corral de colección, montaban el maniquí y permitían la recolección seminal: eyaculación completa). Cuando los animales presentaron este comportamiento rutinario de trabajo, el siguiente paso fue establecer un sistema de colección de semen utilizando la técnica de la mano enguantada.

La obtención de la información que permitió desarrollar el etograma de trabajo se realizó mediante la observación del patrón de comportamiento manifestado por los animales durante el entrenamiento en el corral de trabajo (cortejo, monta, exposición de pene y eyaculación) y la respuesta a los estímulos tanto visuales como olfativos proporcionados por el entrenador. Para ello se diseñó un registro en el cual se describe la clasificación de las variables evaluadas en esta investigación (**Tabla 15**).

Transcurrido el periodo de entrenamiento, se continuó evaluando el trabajo de los animales durante 20 semanas, estableciendo el ritmo de recogida una vez por semana, tiempo durante el cual se continuó recolectando información del comportamiento presentado por los verracos durante su actividad sexual.

3.4.4. Perfiles Hormonales de Verracos Jóvenes.

Se obtuvieron muestras de plasma sanguíneo, las cuales permitieron determinar la concentración de testosterona de los verracos jóvenes (8.5 meses de edad), que se sometieron a un trabajo sistematizado de entrenamiento y trabajo de monta para extracción de semen. Para la determinación de la Testosterona **[T]** se realizó la técnica descrita en el apartado **3.3.3**.

La obtención de las muestras se hizo mediante la colección de sangre en el momento en que el animal se encontraba montando el potro de extracción seminal. Dicho muestreo se realizó con la antisepsia previa de la zona de la oreja, de lo cual por punción de la vena, se obtuvieron las muestras de sangre en tubos BD Vacutainer® de 6mL.

Tabla 15. Variables consideradas para la evaluación del comportamiento sexual de verracos jóvenes.

Variable	Descripción
Líbido	Baja: Falta de interés. Media: Presenta interés por el potro, aunque se distrae y tarda en montar Alta: interés evidente, monta rápida y eyaculación
Tiempo de reacción	Tiempo que tarda en reaccionar ante la presencia del potro o maniquí de monta
Interés por el maniquí	Movimientos y golpes, acompañados de mordisqueo en los costados del maniquí.
Frecuencia de monta	Nº de montas durante el tiempo que permanece en el lugar de trabajo hasta que eyacula
Tiempo a la primera monta	La primera monta que realiza en el potro puede mantenerse en él y exteriorizar el pene o se deja caer y lo sigue intentando.
Tiempo en montar el maniquí	Cuando logra mantenerse en el potro e inicia con una serie de movimientos pélvicos seguidos de la exteriorización del pene con o sin eyaculación
Número de montas falsas	Una serie de montas al maniquí sin mantenerse en él y sin llegar a eyacular
Tiempo y número de veces de exposición de pene	Después de que el animal ha realizado la monta y realiza la exteriorización del pene si está estimulado puede presentar la erección y la posterior eyaculación
Inicio de eyaculación	Momento en el cual el animal está completamente estimulado e inicia con la monta, exteriorización del pene, erección e inicia con una serie de movimientos pélvicos seguidos de contracciones rítmicas del escroto produciendo la eyaculación
Duración del eyaculado	Tiempo que tarda desde que inicia con los movimientos pélvicos hasta que retrae el pene y baja del potro.
Actitud del verraco	Agresividad, nerviosismo o miedo
Otros comportamientos	Vocalizaciones, salivación, olfateos, morder el potro, orinar

Variables obtenidas de Kuster y Althouse, 2006; Hemsworth y Tilbrook, 2007; Hull y Rodríguez-Manzo, 2009.

3.4.5. Evaluación de la Composición Mineral de los Tejidos Reproductivos de Verracos Jóvenes.

En los machos que fueron sometidos a entrenamiento se realizó el mismo procedimiento que fue descrito en el apartado 3.3.1., 3.3.2 y 3.3.2.c. Los minerales que fueron leídos con el Espectrofotómetro fueron: **Zn, Cu, Mg, Mn, y Fe** siguiendo la técnica descrita en el apartado 3.3.2.c.

3.4.6. Evaluación de la Morfometría Testicular.

Al finalizar las 27 semanas de evaluación del comportamiento sexual de los 35 verracos, estos fueron sacrificados. El sacrificio de los verracos se realizó en el matadero frigorífico ESFOSA (Escorxador Frigorífic d'Osona, S.A.), localizado en la provincia de Barcelona, donde se recuperaron los testículos de los verracos. Los cuales fueron

pesados y colocados en cajas térmicas para su conservación a 4°C, hasta su llegada al laboratorio y su posterior análisis.

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre el desarrollo de los testículos se obtuvieron muestras de cada uno para su análisis histológico y con ello evaluar el desarrollo de las **CS** y **CL**, en verracos alimentados con diferentes fuentes y niveles de **Zn** que inician su actividad sexual. Realizando los mismos procedimientos que han sido descritos en el apartado **3.3.4**.

4. RESULTADOS

4.1. Consumo de Pienso en Cerdos Prepúberes

Los resultados que se observan en la **Tabla 16**, no muestran diferencias en el consumo de pienso día^{-1} (**CPD**) de los cerdos tratados durante los periodos analizados (Crecimiento, Desarrollo y Finalización), por lo que al realizar un análisis de interacción **Tratamiento*Tiempo** esta variable no mostró diferencias (**P=0.451**).

Para realizar la evaluación de las interacciones entre los factores evaluados se realizó una comparación con Comparaciones Ortogonales, observando el efecto del tratamiento y el efecto del periodo, los cuales no mostraron diferencias (**P=0.174** y **P=0.45** respectivamente) con el uso de alguna de las fuente, sin importar el nivel de **Zn** utilizado (150ppm vs 200ppm de **Zn**).

Tabla 16. Consumo de pienso por día en cerdos no castrados durante los periodos de crecimiento-finalización.

Tratamiento	Periodo		
	Crecimiento	Desarrollo	Finalización
Control	2.758	2.829	2.645
ZnSO ₄ 150	2.629	2.596	2.324
ZnSO ₄ 200	2.633	2.670	2.481
ZnO150	2.756	2.615	2.469
ZnO200	2.601	2.841	2.540
ZnMet150	2.652	2.778	2.560
ZnMet200	2.694	2.797	2.371
P = F	0.0605	0.0946	0.0912
EEM		0.083	
Comparaciones Ortogonales de Tratamientos			
	Probabilidad (P = F)		
C ₁ = Control vs Resto de Tratamientos	0.148	0.298	0.064
C ₂ = ZnSO ₄ 150 vs ZnSO ₄ 200	0.962	0.434	0.206
C ₃ = ZnO150 vs ZnO200	0.081	0.103	0.600
C ₄ = ZnMet150 vs ZnMet200	0.634	0.891	0.185
C ₅ = Fuentes Inorgánicas (ZnSO ₄ .H ₂ O; ZnO) vs Fuente Orgánica (ZnMet)	0.734	0.234	0.855
C ₆ = ZnSO ₄ .H ₂ O vs ZnO	0.434	0.399	0.291
Tratamiento	0.174		
Periodo	0.451		
Interacción Tratamiento * Tiempo	0.450**		

**EEM= Error estándar de la media: 0.042

Por su parte el tratamiento **Control** demuestra una tendencia a ser diferente con respecto al resto de tratamientos, lo cual se observa en el Contraste **C₁** (**P=0.064**), sin importar la fuente o el nivel de **Zn** utilizado.

Por otro lado, se identificó una tendencia (**P=0.081**) con el uso de **ZnO** ya que puede producir efectos distintos sobre el **CPD** en los cerdos en el periodo de Crecimiento, si se utilizan niveles de 150ppm o 200ppm de **Zn**, esto debido a que el consumo de pienso fue mayor en los animales del tratamiento **ZnO150**.

En cuanto al efecto directo de los tratamientos sobre el consumo de pienso **día⁻¹**, se observó en los tres periodos experimentales, que durante el periodo de Crecimiento los cerdos tuvieron consumos que fueron de 2.601Kg (**ZnO200**) a 2.758Kg (**Control**), esta diferencia de 15g no fue significativa, pero sí muestra una ligera tendencia (**P=0.060**) con respecto al incremento (5.6% más de consumo de pienso **día⁻¹**) requerido por los cerdos tratados con el pienso que no contenía ninguna fuente de **Zn**.

Por su parte los animales en el periodo de Desarrollo, tampoco mostraron un comportamiento distinto respecto al consumo de pienso entre tratamientos (**P=0.094**), a pesar de que las diferencias fueron mayores 248g (8.23%) entre tratamientos. Es importante resaltar que el tratamiento **Control** muestra el mayor consumo de pienso **día⁻¹**.

Con respecto al periodo de Finalización, se observó una tendencia a incrementar el consumo de pienso **día⁻¹** de los cerdos no castrados incluidos en el tratamiento **Control**. Aunque en esta ocasión, y al igual que en la periodo de Desarrollo, la diferencia más marcada fue con **ZnSO₄150**, encontrando en este periodo de Finalización un mayor consumo de pienso **día⁻¹** (12.13%).

Se puede señalar que el incremento en las diferencias en el **CPD**, fueron siempre en el **Control**, el cual no contenía fuente alguna de **Zn**, aportando solamente la cantidad suministrada por los ingredientes mayores del pienso. Es por ello que el análisis de Comparaciones Ortogonales para el periodo de Finalización mostró una tendencia (**P=0.064**) a comportarse diferente respecto al **CPD** entre el tratamiento **Control** y el resto de tratamiento (**C₁**= **Control vs** resto de Tratamientos).

4.2. Consumo de Pienso en Verracos Jóvenes

El consumo de pienso día^{-1} (**CPD**) de los verracos jóvenes que fueron sometidos a entrenamiento para colección seminal, mostró diferencias (**P=0.028**; **EEM=0.009**). Esta variable se mantuvo en un intervalo de 1.96Kg día^{-1} (**ZnSO₄200**) a 2.02Kg día^{-1} (**Control**). A pesar de tan pequeñas diferencias (6g día^{-1}), existió un comportamiento distinto entre verracos (**P=0.0001**; **EEM=0.021**), ya que el **CPD** tuvo intervalos de 1.8 Kg día^{-1} a 2.5Kg día^{-1} , esta variación se debió a que durante la etapa de pubertad y bajo un régimen de entrenamiento los verracos jóvenes deben mantener un peso y condición corporal (**CC**) idónea para iniciar su actividad de monta en el maniquí para la obtención de dosis seminales. Sin embargo, cada semental presenta necesidades distintas para poder mantener la **CC=3**.

Los tratamientos que mostraron mayor variación en el **CPD** fueron el **Control** y **ZnSO₄200**, en tanto que la mayor constancia fue reflejada en los animales que consumieron los tratamientos con **ZnO** y **ZnMet**.

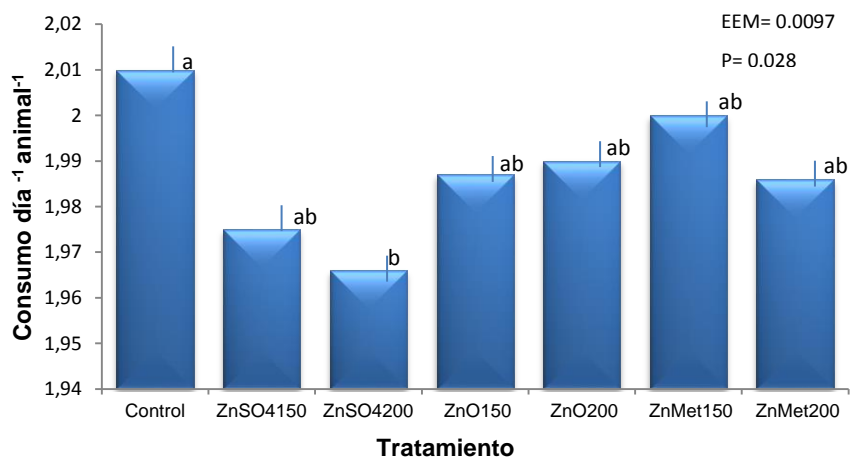
Al realizar la comparación de las interacciones utilizando el método de Contrastes Ortogonales (**Tabla T17**), se observó que el tratamiento **Control** presentaba la misma pauta de comportamiento que en el periodo de Crecimiento-Finalización, es decir mayor **CPD** (con un intervalo de 1.8 a 2.5Kg día^{-1}), por lo que se observó un efecto significativo para el contraste **C₁** (**P=0.0126**).

Por su parte el contraste **C₆**, mostró que existe una tendencia a diferir en el **CPD** (**P=0.064**) cuando se utiliza una fuente sulfatada o una fuente oxidada de **Zn**. En la **Gráfica 1**, se observa como los animales del tratamiento con **ZnSO₄** en sus dos niveles mostraron menor consumo que aquellos animales de los tratamientos que utilizaron como fuente el **ZnO**.

En los verracos jóvenes evaluados durante el periodo de entrenamiento, se puede observar que el **CPD** mostró que las diferencias encontradas (**P<0.05**) se debieron al tratamiento utilizado.

Por otra parte, la interacción **Tratamiento*Tiempo** mostro efecto significativo en la variable **CPD** (**P<0.0005**).

RESULTADOS



Gráfica. 1. Medias de mínimos cuadrados del consumo de pienso por día de verracos jóvenes en etapa de entrenamiento.

Tabla 17. Comparaciones ortogonales del consumo de pienso de los tratamientos con diferente fuente y nivel de Zn en verracos jóvenes, en etapa de entrenamiento.

Comparaciones ortogonales	Probabilidad (P = F)
C₁= Control vs resto de Tratamientos	0.0126
C₂= ZnSO₄150 vs ZnSO₄200	0.5340
C₃= ZnO150 vs ZnO200	0.8575
C₄= ZnMet150 vs ZnMet200	0.3385
C₅= Fuentes Inorgánicas (ZnSO₄.H₂O; ZnO) vs Fuente Orgánica (ZnMet)	0.1104
C₆= ZnSO₄.H₂O vs ZnO	0.064
Tratamiento	0.028
Periodo	0.69
Interacción Tratamiento * Tiempo	<0.0005
EEM	0.017

4.3. Ganancias de Peso en Cerdos Prepúberes

En la evaluación de la **Ganancia Diaria de Peso (GDP)** de los cerdos prepúberes se pueden observar diferencias entre los tratamientos aplicados, así como en las etapas evaluadas durante el periodo de crianza (**Tabla 18**).

En el periodo de Crecimiento, las **GDP** fueron mayores en los animales pertenecientes al tratamiento con 150ppm de **Zn**, aplicada a través de la fuente **ZnO**.

Por su parte durante el periodo de Desarrollo y Engorda, las mayores **GDP** fueron para los cerdos prepúberes que consumieron el pienso que no contenía fuente alguna de **Zn (PB)**. Encontrando que el periodo en el que existieron mayores diferencias entre los tratamientos fue en el de Crecimiento. Las diferencias en **GDP** entre los niveles de **Zn** otorgados por el **ZnO** fueron grandes (241g). Asimismo también se observó que las diferencias entre fuentes inorgánicas y orgánicas fueron significativas (**P=0.016**) y ~77g por día de ganancia de peso.

En el caso del periodo de Desarrollo, todos los tratamientos se comportaron de forma más homogénea, y no se observaron diferencias entre fuentes y niveles de **Zn**, sin embargo el tratamiento **Control** produjo una **GDP** de 139g más que el resto de los tratamientos.

En el caso del periodo de Finalización, el tratamiento **Control** una vez más tuvo la **GDP** mayor, la diferencia entre los tratamientos que contenían **Zn** no fue superior a la encontrada entre el **Control** y el resto de los tratamientos (Contraste **C₁**; **P=0.0007**), pero sí se observa una tendencia entre los niveles de **Zn** aportados por la fuente **ZnMet** (Contraste **C₄**) a aumentar la **GDP** principalmente en los animales del tratamiento **ZnMet200**.

RESULTADOS

Tabla 18. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar del efecto de la fuente y nivel de Zn en cerdos prepúberes y su relación con la ganancia de peso diario.

Tratamiento	Periodo		
	Crecimiento	Desarrollo	Finalización
Control	0.740 ^b	0.954a	0.979a
ZnSO ₄ 150	0.630 ^b	0.760b	0.863ab
ZnSO ₄ 200	0.675b	0.865ab	0.912ab
ZnO150	0.916a	0.874ab	0.806b
ZnO200	0.743 ^b	0.784ab	0.822b
ZnMet150	0.667 ^b	0.837ab	0.793b
ZnMet200	0.661 ^b	0.769b	0.892ab
P = F	<0.0001	0.043	0.003
EEM	0.035	0.044	0.033
Comparaciones Ortogonales de Tratamientos			
	Probabilidad (P = F)		
C ₁ = Control vs Resto de Tratamientos	0.561	0.006	0.0007
C ₂ = ZnSO ₄ 150 vs ZnSO ₄ 200	0.365	0.095	0.309
C ₃ = ZnO150 vs ZnO200	0.001	0.167	0.735
C ₄ = ZnMet150 vs ZnMet200	0.913	0.290	0.042
C ₅ = Fuentes Inorgánicas (ZnSO ₄ .H ₂ O; ZnO) vs Fuente Orgánica (ZnMet)	0.016	0.646	0.794
C ₆ = ZnSO ₄ .H ₂ O vs ZnO	<0.0001	0.706	0.032
Tratamiento	0.0004		
Periodo	<0.0001		
Interacción Tratamiento * Tiempo	0.0092		

4.4. Ganancia Diaria de Peso en Verracos Jóvenes.

En la **Tabla 19** se pueden observar los resultados obtenidos en cuanto a la **GDP** durante el periodo de evaluación de los verracos jóvenes.

Para el caso de los verracos jóvenes evaluados, se obtuvo la ganancia de peso semanalmente (**GPS**). Se puede observar que estas no mostraron efecto de tratamiento (**P=0.91**), aunque se observa un valor mayor en los tratamientos que contenían como fuente **ZnO** y en el tratamiento **ZnSO₄200**. Por su parte, la evaluación de la interacción **Tratamiento*Tiempo**, no arrojó diferencias dentro de tratamientos (**P=0.23**) durante las

16 semanas del experimento pero, identifica al **ZnSO₄150** y al **ZnMet150** como los tratamientos con **GPS** más bajos, siendo el **ZnO200** el de mayor ganancia media durante 8 semanas (**Gráfica 2**).

Tabla 19. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de variables relacionadas con el comportamiento productivo de verracos jóvenes alimentados con piensos que contenían diferentes fuentes y niveles de Zn.*

Tratamiento	Variables		
	PI (Kg)	PF (Kg)	GPS** (g)
Control	142.48	166.16.	1.410
ZnSO ₄ 150	142.48	161.62	1.260
ZnSO ₄ 200	145.40	169.85	1.680
ZnO150	145.64	166.94	1.610
ZnO200	149.25	175.67	1.690
ZnMet150	139.70	161.20	1.320
ZnMet200	140.80	164.04	1.480
EEM	2.99	5.97	0.260
Probabilidad (P = F)	0.33	0.092	0.91

*Comportamiento productivo de verracos (n=35): Peso inicial (**PI**); Peso Final (**PF**); Ganancia de Peso Semana⁻¹ (**GPS**); Periodo de Evaluación: 16 semanas. Error estándar (**EEM**). **La variable **GPS** fueron analizadas utilizando como covariable para el **PF** el **PI**. ^{a,b} Medias con distinto superíndice en columna son diferentes (P = F).

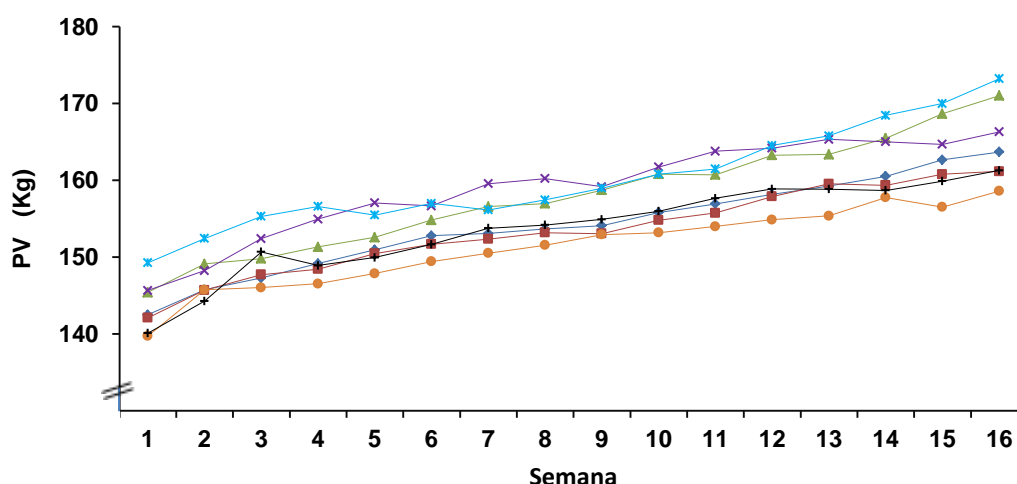


Gráfico 2. Peso vivo (PV) por tratamiento durante el periodo evaluado. Las líneas representan medias semana⁻¹: **Control** ◆ ; **ZnSO₄150** ■ ; **ZnSO₄200** ▲ ; **ZnO150** ✕ ; **ZnO200** * ; **ZnMet150** ● ; **ZnMet200** +. Error estándar de la media (**EEM**): **PV** (EEM, 3.54, n=551); **CC** (EEM, 0.23, n=551). Probabilidad de la interacción Tratamiento*Tiempo **NS** (P = 0.23).

4.5. Conversión Alimenticia en Cerdos Prepúberes

Los resultados de **CA** indicaron que en la etapa de Crecimiento no existieron diferencias (**P=0.362**) entre los tratamientos, y los valores observados fueron de 3.29 a 3.85, **EEM=0.171**. Al analizar el efecto de la etapa de Crecimiento con los dos restantes (Desarrollo y Finalización) se observó un efecto diferente (**P=0.0002**) ya que el periodo de Crecimiento mostró mayor **CA** (Crecimiento= 3.54 **vs** Desarrollo=3.17; Finalización=3.39; **EEM=0.065**), lo cual indica que durante dicho periodo, los tratamientos ejercieron un efecto negativo sobre la **CA**, ya que en esta etapa se aumentó el valor de la variable **CA** (Interacción **Tratamiento*Tiempo**; **P=0.053**).

Durante el periodo de Desarrollo se observa una diferencia en los valores de **CA**, al compararlos con el periodo de Finalización (**P=0.0002**), asimismo se observó que la interacción **Tratamiento*Tiempo** mostró un efecto significativo en la **CA**, ya que la **CA** de los cerdos en Finalización se incrementó al menos por 220g.

En tanto que, en el periodo de Finalización, se observaron diferencias por efecto de los tratamientos, ya que los cerdos prepúberes mostraron que al utilizar 150ppm con **ZnSO₄** se redujo en 1.165Kg de alimento por Kg de peso ganado. En el caso del tratamiento **ZnMet200** se observó también una reducción en la **CA**.

Existe evidente diferencia entre los niveles de **Zn** utilizados en los tratamientos con **ZnSO₄** (Contraste **C₂**) (**P=0.0002**), así como en los niveles de **ZnMet** (Contraste **C₄**). Así también se puede señalar que se produjo una menor **CA** (~346g) cuando se utilizó la fuente orgánica (Contraste **C₆**).

Por lo tanto, utilizar 200ppm con **ZnO** en cerdos prepúberes en el periodo de Desarrollo, mostró un incremento de la **CA** de 536g.

Tabla 20. Efecto de la fuente y nivel de Zn en la conversión alimenticia de cerdos no castrados en el periodo de producción crecimiento-finalización.

Tratamiento	Periodo		
	Crecimiento	Desarrollo	Finalización
Control	3.397	2.880 ^b	3.445 ^{ab}
ZnSO ₄ 150	3.449	3.114 ^{ab}	2.952 ^b
ZnSO ₄ 200	3.543	3.114 ^{ab}	4.117 ^a
ZnO150	3.297	2.887 ^b	3.520 ^{ab}
ZnO200	3.651	3.423 ^{ab}	3.421 ^{ab}
ZnMet150	3.603	3.223 ^{ab}	3.449 ^{ab}
ZnMet200	3.853	3.561 ^a	2.859 ^b
P = F	0.171	0.146	0.203
EEM	0.362	0.016	0.002
Comparaciones Ortogonales de Tratamientos			
Probabilidad (P = F)			
C ₁ = Control vs Resto de Tratamientos	0.3696	0.0387	0.7895
C ₂ = ZnSO ₄ 150 vs ZnSO ₄ 200	0.6929	0.9988	0.0002
C ₃ = ZnO150 vs ZnO200	0.1542	0.0142	0.7323
C ₄ = ZnMet150 vs ZnMet200	0.3125	0.1146	0.0535
C ₅ = Fuentes Inorgánicas (ZnSO ₄ .H ₂ O; ZnO) vs Fuente Orgánica (ZnMet)	0.1099	0.0499	0.0587
C ₆ = ZnSO ₄ .H ₂ O vs ZnO	0.8963	0.7803	0.7511
Tratamiento	0.110		
Periodo	0.0002		
Interacción Tratamiento * Tiempo	0.053		

4.6. Índice Gonadosomático de Verracos Jóvenes.

Las variables evaluadas en los testículos de los cerdos prepúberes (Tabla 21), así como el **IG** obtenido, no mostraron diferencias (**P>0.05**) por efecto de los tratamientos aplicados.

No obstante, los intervalos de valor en los pesos de los testículos estuvieron entre 0.305Kg a 0.328Kg para el **PTD**, mientras que el **PTI** mostró mayor amplitud en los valores de peso (0.295 Kg a 0.343Kg), llegando a observar hasta 48g de diferencia entre los testículos de los verracos del tratamiento que contenía 150ppm de Zn aplicado con ZnSO₄ y los que provenían de verracos tratados con ZnMet150.

Por su parte el **PV** de los cerdos no difirió entre los tratamientos (**P=0.926**), como tampoco lo hicieron los **IG** de ambos lados (**IGI, P=0.836; IGD, P=0.784**), incluido el valor del **IGM (P=0.866)**. Los valores del **IG** no fueron superiores a 0.21, y los **IG** fueron tan pequeños como 0.184.

RESULTADOS

En el **Tabla 22**, se observa que el crecimiento testicular fue significativamente homogéneo en ambos testículos por lo que la correlación entre ambos fue significativamente mayor a $r=0.82$ ($P<0.0001$). Por su parte el **PV** no mostró correlación alguna con el **PTD**, **PTI** o **PTM** ($P>0.05$), en tanto que el **PV** de los verracos mostró una correlación negativa ($P>0.0001$) de $r=0.580$ con los valores de los índices gonadosomáticos. Caso contrario fue observado al analizar la correlación entre **IGM** y **PTM**, se encontró que era de $r=0.774$.

Tabla 21. Medias de mínimos cuadrados del efecto de la fuente y nivel de Zn, en el peso testicular, peso vivo e índice gonadosomático de verracos jóvenes.

Tratamiento	n	PTD Kg	PTI Kg	PTM Kg	PV Kg	IGD	IGI	IGM
Control	36	0.305	0.317	0.312	166.16	0.184	0.191	0.188
ZnSO ₄ 150	36	0.308	0.295	0.302	161.62	0.191	0.183	0.187
ZnSO ₄ 200	36	0.320	0.336	0.328	169.85	0.189	0.198	0.194
ZnO150	36	0.318	0.316	0.317	166.94	0.191	0.189	0.190
ZnO200	36	0.328	0.328	0.319	162.04	0.209	0.208	0.204
ZnMet150	36	0.327	0.343	0.335	161.20	0.203	0.213	0.209
ZnMet200	36	0.311	0.315	0.303	164.20	0.189	0.192	0.185
P = F		0.946	0.744	0.837	0.926	0.836	0.784	0.866
EEM		0.017	0.021	0.018	5.97	0.013	0.015	0.014
Comparaciones Ortogonales de Tratamientos								
Probabilidad (P = F)								
C ₁ = Control vs Resto de Tratamientos		0.490	0.838	0.796	0.778	0.436	0.715	0.669
C ₂ = ZnSO ₄ 150 vs ZnSO ₄ 200		0.634	0.161	0.310	0.323	0.891	0.453	0.738
C ₃ = ZnO150 vs ZnO200		0.692	0.687	0.964	0.571	0.348	0.380	0.504
C ₄ = ZnMet150 vs ZnMet200		0.504	0.360	0.225	0.728	0.470	0.324	0.242
C ₅ = Fuentes Inorgánicas (ZnSO ₄ .H ₂ O; ZnO) vs Fuente Orgánica (ZnMet)		0.983	0.590	0.877	0.646	0.902	0.544	0.810
C ₆ = ZnSO ₄ .H ₂ O vs ZnO		0.582	0.749	0.862	0.835	0.439	0.577	0.631

PTD= Peso testicular derecho; PTI= Peso testicular izquierdo; PV= Peso vivo; IGD= Índice gonadosomático derecho; IGI= Índice gonadosomático izquierdo; IGM= Índice gonadosomático medio.

Tabla 22. Correlación entre las características físicas testiculares, índice gonadosomático y peso vivo de verracos tratados con diferentes fuentes y niveles de Zn.

Variables	PTD	PTI	PTM	PV	IGD	IGI	IGM
PTD	1.000	0.827*	0.903*	0.094	0.730*	0.675*	0.684*
PTI	0.827*	1.000	0.952*	0.105	0.582*	0.813*	0.707*
PTM	0.903*	0.952*	1.000	0.054	0.674*	0.799*	0.774*
PV	0.094	0.105	0.054	1.000	-0.600*	-0.484*	-0.580*
IGD	0.731*	0.582*	0.674*	-0.600*	1.000	0.871*	0.943*
IGI	0.675*	0.814*	0.799*	-0.484*	0.871*	1.000	0.962*
IGM	0.684*	0.707*	0.774*	-0.580*	0.943*	0.962*	1.000

PTD= Peso Testicular Derecho; PTI= Peso Testicular Izquierdo; PTM=Peso Testicular Medio; PV=Peso Vivo; IGD=Índice Gonadosomático Derecho; IGI=Índice Gonadosomático Izquierdo; IGM=Índice Gonadosomático Medio.

4.7. Análisis de la Concentración de Células de Leydig, Células de Sertoli, Peso Testicular, Peso Vivo y Concentración de Testosterona en Cerdos Prepúberes y Verracos Jóvenes.

Los resultados obtenidos de la evaluación histológica de los testículos de los cerdos prepúberes se muestran en la **Tabla 23**, donde se puede observar que el número de células de Leydig (**CL**) presentes por testículo, sí fue afectado por los tratamientos ($P<0.0001$). En el caso del tratamiento **Control** se observa que fueron los animales que presentaron un efecto negativo sobre el número de **CL**, **este efecto fue encontrado en ambos testículos**. Los valores encontrados en los tratamientos que contenían **Zn**, presentaron una media entre 18.33 y 20.52 **CL** por μm^2 , observando que el número de **CL** del tratamiento **Control** disminuyó a 14.01 **CLD**, 14.33 **CLI** y 14.03 **CLM**. En el caso del análisis de comparaciones ortogonales, se identificó el mismo efecto ($C_1=<0.0001$).

Para el caso de la variable **PT**, se observó que ambos testículos presentan diferencias de peso (**g**) entre tratamientos (**PTD**, $P=0.059$; **PTI**, $P=0.044$). La fuente sulfatada a niveles de 200ppm incidió en una reducción del crecimiento de estos órganos. La reducción encontrada en los testículos del tratamiento **ZnSO₄200** fue de un tercio (32.5%) del tamaño observado en el tratamiento **ZnSO₄150**.

Sin embargo, los valores de **PT** del resto de tratamientos mostraron un intervalo de valor de 308.00g a 354.96g, que aunque no representa diferencias ($P>0.05$) estos valores manifiestan a través del análisis de comparaciones ortogonales una tendencia (C_1 : **PTD**, $P=0.075$; **PTI**, $P=0.067$; **PTM**, $P=0.090$) a ser diferentes, es decir un crecimiento distinto entre testículos en los animales del tratamiento **Control**.

Por su parte el peso vivo (**PV**) también reveló diferencias en los tratamientos aplicados a los cerdos prepúberes (**P=0.027**), los cuales indican que al utilizar 200ppm de **Zn** con la fuente **Metionatada** se produce un efecto positivo y con ello mayor **PV**. Al evaluar el efecto entre los niveles de **Zn**, se observó que los tratamientos con la fuente de **Óxido** y **Metionato** mostraron diferencias al utilizar 200ppm encontrando que hay un incremento de 9kg a 14Kg más que con las fuentes **Metionato** y **Óxido** a concentraciones de 150ppm respectivamente. En el caso de la fuente de **Zn Metionato** se observó una tendencia a mejorar el **PV** cuando se aumentó a 200ppm de **Zn** (**P=0.085**), esta tendencia fue de aproximadamente 10Kg de **PV** al finalizar esta fase de la investigación.

En el caso de las concentraciones de Testosterona [**T**] se encontró que existen diferencias entre tratamientos (**P=0.010**). La [**T**] fue mayor en los tratamientos en los que se utilizaron las fuentes orgánicas.

En tanto que al evaluar los resultados obtenidos con las fuentes inorgánicas y el tratamiento **Control** se pudo identificar que la [**T**] no fue diferente (**P>0.05**). Los intervalos de valor que fueron mostrados por los tratamientos inorgánicos estuvieron entre los valores de [**T**]= 2.52 a 2.88ng/mL⁻¹. En tanto que el intervalo mostrado por los tratamientos orgánicos, fue mayor, observando valores de 3.48ng/mL⁻¹ (**ZnMet200**) a 4.05ng/mL⁻¹ (**ZnMet150**), aunque no fueron diferentes entre ellos (**C₄**; **P=0.168**).

También se observan concentraciones distintas de al menos 0.57ng/mL⁻¹, y de 1.46ng/mL⁻¹ entre el **Control** y el **Zn Met150ppm**.

El número de **CL** estuvieron relacionadas (**r=0.92**) significativamente (**P<0.025**) entre los testículos del lado derecho (**CLD**) e izquierdo (**CLI**). Asimismo, las **CL** no presentan relación (**P>0.05**) con el **PTD**, **PTI**, **PTM**, **PV** y [**T**] (**Tabla 24**).

Por su parte el **PT** mostró una alta correlación (**r=0.773**), entre **PTD** y **PTI**, lo cual indicó que aun y cuando existen diferencias en el peso de los testículos debido a los tratamientos, el crecimiento testicular en el testículo derecho e izquierdo es muy similar (**Tabla 24**), lo cual se puede observar en los valores de correlación (**r>0.927**; **P<0.0001**).

En cuanto al **PT** y su relación con el **PV**, se observó que existe una correlación de media a alta con valor de **r=0.569** (**P=0.007**), a **r=0.748** (**P<0.0001**) para los **PTD** y **PTI** respectivamente.

TABLA 23

RESULTADOS

Tabla 24. Correlaciones entre las variables de células de Leydig, peso testicular, peso vivo y concentración de Testosterona sanguínea en cerdos prepúberes.

Variable	CLD	CLI	CLM	PTD	PTI	PTM	PV	[T]
CLD	1.000	0.980 <0.025	0.920 <0.001	0.262 0.251	0.089 0.700	0.176 0.443	0.045 0.846	0.235 0.304
CLI	0.980 <0.025	1.000	0.870 <0.001	0.164 0.848	0.127 0.694	0.111 0.532	0.146 0.731	0.174 0.161
CLM	0.920 <0.001	0.870 <0.001	1.000	0.316 0.274	0.200 0.481	0.058 0.274	0.123 0.751	0.297 0.274
PTD	0.262 0.251	0.164 0.848	0.316 0.274	1.000	0.773 <0.0001	0.927 <0.0001	0.569 0.007	0.303 0.181
PTI	0.089 0.700	0.127 0.694	0.200 0.481	0.773 <0.0001	1.000	0.954 <0.0001	0.748 <0.0001	0.235 0.305
PTM	0.176 0.443	0.111 0.532	0.058 0.274	0.927 <0.0001	0.954 <0.0001	1.000	0.716 0.0003	0.181 0.432
PV	0.045 0.846	0.146 0.731	0.123 0.751	0.569 0.007	0.748 <0.0001	0.716 0.0003	1.000	0.164 0.477
[T]	0.235 0.303	0.174 0.161	0.297 0.274	0.303 0.181	0.235 0.305	0.181 0.432	0.164 0.477	1.000

*CLD=Células de Leydig Derecha; CLI=Células de Leydig Izquierda; CLM=Células de Leydig Media; PTD=Peso Testicular Derecho; PTI=Peso Testicular Izquierdo; PTM=Peso Testicular Medio; PV=Peso Vivo; [T]=Concentración de Testosterona.

En el caso de la [T] los valores se reportan en ng/mL^{-1} de testosterona sanguínea, los cuales no presentan relación con el número de CL encontradas en los testículos de los cerdos prepúberes, ni tampoco con el peso de los testículos ($P > 0.181$). Asimismo, tampoco se observó correlación alguna con el PV ($r = 0.164$; $P = 0.477$).

Los verracos jóvenes mostraron (Tabla 25) que el número de CL en el parénquima testicular de ambos testículos, fue afectado por el tratamiento ($P < 0.007$). Se observó una reducción del 19.34% en las CL en el testículo derecho, y de 9.76% en el izquierdo. En ambos casos las diferencias fueron significativas ($P < 0.05$).

Observando los valores medios de las CL en los testículos de los verracos jóvenes se puede destacar que el tratamiento **Control** afectó negativamente el número de CL ($P < 0.0001$) comparado con el resto de tratamientos (C_1, \dots, C_6). Aunque entre los tratamientos adicionados con Fuente y Nivel de Zn (C_2, \dots, C_6) no mostraron diferencias ($P > 0.05$).

Es importante señalar que las diferencias entre CL se observan en un intervalo de 15.60 a 19.66 CL en el testículo derecho, en tanto que en el izquierdo los valores estuvieron entre 17.00 a 19.20 CL, lo cual indica que existió una pérdida del doble de CL al utilizar el tratamiento **Control** en los verracos jóvenes. Por ello se considera que

25ppm no fueron suficientes para sostener el desarrollo de las **CL** de los verracos jóvenes.

Al comparar los valores entre los cerdos prepúberes y verracos jóvenes, se presenta el mismo comportamiento, es decir una reducción del número de **CL** en ambas etapas del desarrollo, al utilizar el tratamiento **Control**.

Cuando se realizó un análisis por etapa se observó que no existe efecto en el número de **CL** en la interacción **Tratamiento*Tiempo**, los valores obtenidos de los testículos de cerdos prepúberes, son similares a los valores observados en la etapa de verraco jóvenes (**P>0.05**).

En cuanto al peso testicular de los verracos jóvenes, ambos testículos tuvieron un peso medio de entre 305.70g a 328.20g en el testículo derecho y 294.80g a 342.80g en el testículo izquierdo. Se pudo observar que los testículos del lado derecho mostraron diferencias menores entre los individuos valorados (22g de diferencia), en tanto que los del lado izquierdo mostraron una diferencia mayor (48g de diferencia), en ambos casos estas diferencias no fueron significativas (**P=0.944**; **P=0.744** respectivamente).

Sin embargo, al comparar los pesos de los testículos de los cerdos prepúberes y de los verracos jóvenes se observó que no existían diferencias (**P=0.672**) entre las dos etapas evaluadas. A pesar de la diferencia de edad a la que fueron evaluados los testículos, y la actividad reproductiva a la que fueron sometidos los verracos jóvenes, el peso no fue mayor en estos últimos.

El **PV** en los verracos jóvenes tampoco mostro diferencias (**P=0.092**), lo cual es entendible si se considera que los verracos tuvieron un suministro de alimento restringido y siempre valorado en función del peso ganado cada semana y la condición corporal (**CC3**) mostrada. Esto con la idea de evitar que los verracos se engrasen.

Para el caso de la concentración de testosterona [**T**] en los verracos jóvenes, las diferencias muestran que esta hormona fue significativamente menor en el tratamiento **Control** a la concentración plasmática encontrada en el resto de los tratamientos (**P=0.050**). No existió evidencia que indicara que la utilización de fuentes orgánicas o inorgánicas ocasionara algún efecto distinto. Tampoco el nivel de **Zn** generó diferencias, aunque se mostró un valor mayor de Testosterona en los tratamientos que contenían la fuente orgánica de **Zn** en ambos niveles.

Tabla 25

Al analizar los valores de testosterona en el plasma sanguíneo de los cerdos prepúberes las concentraciones tuvieron la misma tendencia, ya que el Control fue quien menor concentración presentó, encontrando que los tratamientos con **Zn** orgánico presentaron una **[T]** mayor.

En el caso de los verracos jóvenes, a diferencia de los cerdos prepúberes, sí presentaron una correlación positiva entre las **CLM** y la **[T]** ($r=0.314$; $P=0.05$). Asimismo, se observó una correlación ($P=0.005$) entre **PT** de ambos testículos y **PTM** con la **[T]**, la cual tuvo valores de $r=0.456$ (Tabla 26).

Tabla 26. Correlación entre las variables histológicas testiculares (CLD, CLI, CLM), peso testicular (D, I, M), peso vivo y concentración de Testosterona sanguínea en verracos jóvenes*.

Variables	CLD	CLI	CLM	PTD	PTI	PTM	PV	[T]
CLD	1.000	0.529	0.935	0.259	0.088	0.182	0.257	0.318
		0.0009	<.0001	0.126	0.607	0.285	0.029	0.058
CLI	0.529	1.000	0.794	0.066	0.008	0.043	0.364	0.209
	0.0009		<.0001	0.700	0.962	0.800	0.029	0.021
CLM	0.935	0.794	1.000	0.158	0.066	0.112	0.335	0.314
	<.0001	<.0001		0.356	0.698	0.511	0.045	0.051
PTD	0.259	0.066	0.158	1.000	0.826	0.903	0.094	0.434
	0.126	0.700	0.356		<.0001	<.0001	0.584	0.008
PTI	0.088	0.008	0.066	0.826	1.000	0.951	0.105	0.462
	0.607	0.962	0.698	<.0001		<.0001	0.542	0.004
PTM	0.182	0.043	0.112	0.903	0.951	1.000	0.053	0.456
	0.285	0.800	0.511	<.0001	<.0001		0.758	0.005
PV	0.257	0.364	0.335	0.094	0.105	0.053	1.000	0.139
	0.029	0.029	0.045	0.584	0.542	0.758		0.415
[T]	0.318	0.209	0.314	0.434	0.462	0.456	0.139	1.000
	0.058	0.021	0.051	0.008	0.004	0.005	0.4159	

*CLD=Célula de Leydig derecha; CLI=Célula de Leydig Izquierda; PTD=Peso testicular derecho; PTI= Peso testicular izquierdo; PV= Peso Vivo; [T]= Concentración de testosterona sanguínea.

El diámetro tubular seminífero (**DTS**) en los testículos de cerdos prepúberes (Tabla 27) no mostró diferencias en ambos testículos (**DTD**, $P=0.401$; **DTI**, $P=0.260$), asumiendo además que el valor medio del **DTS** no fue distinto ($P=0.331$) entre los tratamientos. Sin embargo, al analizar los valores entre óxidos, mediante las comparaciones ortogonales, se observa una tendencia a tener mayor tamaño en los túbulos seminíferos del tratamiento con **150ppm** de **Zn** utilizando **Óxido** (**C₃**: **DTD**, $P=0.086$; **DTI**, $P=0.056$; y **DTM**, $P=0.066$), ya que el **ZnO200** redujo el diámetro tubular en **14μm**, lo cual representa ~12% del tamaño de los túbulos seminíferos encontrados en esta investigación.

RESULTADOS

Por su parte los verracos jóvenes mostraron que el **DTS (Tabla 28)** fue igual en todos los tratamientos. En ambos testículos no se observaron diferencias ($P>0.289$). El **DTS** observado en ambos testículos se presentó en un intervalo de valor de $127.70\mu\text{m}$ a $145.36\mu\text{m}$ de diámetro.

A diferencia de los cerdos prepúberes, en los verracos jóvenes existió una tendencia de incremento en los **DTS** en los verracos que consumieron **ZnSO₄200** a diferencia de los que consumieron **150ppm** con la misma fuente mineral (**C₂**).

Tabla 27. Medidas de mínimos cuadrados \pm error estándar de la media, comparaciones ortogonales de las variables: Diámetro Tubular Seminífero, células de Sertoli en cerdos prepúberes.

Tratamiento	DTD μm	DTI μm	DTM μm	CSD No.	CSI No.	CSM No.
Control	120.70 \pm 0.98	127.66 \pm 3.75	124.18 \pm 1.70	4.80 \pm 0.34 ^a	4.65 \pm 0.49 ^a	4.72 \pm 0.41 ^a
ZnSO ₄ 150	122.06 \pm 8.31	123.33 \pm 7.05	122.78 \pm 7.67	2.40 \pm 0.34 ^b	2.50 \pm 0.34 ^b	2.45 \pm 0.34 ^b
ZnSO ₄ 200	120.33 \pm 7.79	122.66 \pm 4.97	121.50 \pm 6.37	1.60 \pm 0.05 ^b	1.70 \pm 0.01 ^b	1.65 \pm 0.02 ^b
ZnO150	126.60 \pm 0.80	127.33 \pm 0.88	126.96 \pm 0.84	2.90 \pm 0.63 ^b	3.00 \pm 0.64 ^b	2.95 \pm 0.63 ^b
ZnO200	112.40 \pm 2.30	113.00 \pm 1.52	112.70 \pm 1.90	1.90 \pm 0.28 ^b	2.00 \pm 0.29 ^b	1.95 \pm 0.28 ^b
ZnMet150	122.13 \pm 4.06	122.70 \pm 4.25	122.40 \pm 4.16	1.30 \pm 0.17 ^b	1.40 \pm 0.17 ^b	1.35 \pm 0.17 ^b
ZnMet200	130.00 \pm 7.34	135.66 \pm 7.51	131.4 \pm 7.43	1.85 \pm 0.20 ^b	1.95 \pm 0.21 ^b	1.90 \pm 0.19 ^b
P = F	0.401	0.260	0.331	<0.0001	0.0003	0.0002
EEM	5.44	4.874	5.06	0.337	0.362	0.349
Comparaciones Ortogonales de Tratamientos						
Probabilidad (P = F)						
C ₁ = Control vs Resto de Tratamientos	0.773	0.436	0.822	<0.0001	<0.0001	<0.0001
C ₂ = ZnSO ₄ 150 vs ZnSO ₄ 200	0.825	0.924	0.869	0.1159	0.1407	0.127
C ₃ = ZnO150 vs ZnO200	0.086	0.056	0.066	0.054	0.0712	0.062
C ₄ = ZnMet150 vs ZnMet200	0.268	0.212	0.232	0.268	0.3011	0.283
C ₅ = Fuentes Inorgánicas (ZnSO ₄ .H ₂ O; ZnO) vs Fuente Orgánica (ZnMet)	0.208	0.207	0.199	0.050	0.0662	0.057
C ₆ = ZnSO ₄ .H ₂ O vs ZnO	0.759	0.570	0.661	0.255	0.288	0.271

*DTD= Diámetro Tubular Derecho; DTI= Diámetro Tubular Izquierdo; CSD= Células de Sertoli Derecha; CSI= Células de Sertoli Izquierdo; PTD= Peso Testicular Derecha; PTI= Peso Testicular Izquierdo; PV= Peso Vivo; [T]= Concentración de Testosterona Sanguínea.

Al analizar los datos en ambas fases de crecimiento, se observa que los verracos jóvenes tuvieron un diámetro tubular seminífero mayor de entre $15\mu\text{m}$ a $20\mu\text{m}$.

En el caso de las **CS** se observó que el mayor número lo presentaron los cerdos prepúberes tratados con el pienso que no fue adicionado con una fuente de **Zn** ($P<0.0001$), por lo tanto ambos testículos mostraron que el desarrollo de las **CS** fue

mayor en el **Control**. La cantidad de **CS** que presentó el **Control** fue de al menos un 50% más.

Por su parte, al realizar el análisis de comparaciones ortogonales se observó en el **C₃**, que los **Óxidos** tuvieron un mínimo comportamiento distinto y negativo (**P<0.05**), produciendo una reducción de al menos una **CS** por túbulo seminífero.

En el caso de los verracos jóvenes se observó que el número de **CS** también fue diferente (**P<0.050**) entre los tratamientos, ya que el **Control** fue el que mayor número de **CS** presentó (**CSD**= 4.76; **CSI**=3.48; **CSM**=4.12), y el resto de los tratamientos mostraron valores entre 1.48 y 2.56 **CS** (**C₁**).

Aunque el número menor de **CS** se observó en el tratamiento con 200ppm de **ZnMet** (**CSD**=1.88; **CSI**=1.48; **CSM**=1.68) estos valores no mostraron diferencias significativas con el resto de los tratamientos.

Al comparar el **DTS** de los cerdos prepúberes **vs** verracos jóvenes se observó que existía un aumento en el diámetro tubular, el cual fue de al menos en media de 11.5µm. También se observó que el efecto del **ZnMet** en los animales prepúberes fue positivo, ya que los tratamientos con la fuente orgánica presentaron un mayor **DTS**, en tanto que los verracos jóvenes redujeron su desarrollo tubular.

Por su parte los análisis de Correlación en los cerdos prepúberes permitieron identificar que la **r** del **DTS** de ambos lados es mayor a **r>0.921**, y significativo (**P<0.0001**), lo cual es lógico si se observan que los valores obtenidos al medir los **DTS** fueron similares en ambos testículos.

Sin embargo, al analizar el grado de correlación que existía entre el **DTS** de ambos testículos, con el número de **CS** en cada lado testicular en los cerdos jóvenes, no se identificó ninguna correlación (**r<0.16**; **P>0.469**).

En el caso de las **CS** que se observan en cada testículo (**Tabla 27**), existió una alta correlación entre **CSD** con **CSI** (**r=0.996**; **P<0.0001**) (**Tabla 29**).

En el caso del **DTS**, se observó que existió una correlación significativa (**P<0.0002**) y alta (**r=0.731**) entre los valores de peso que mostraron ambos testículos en los cerdos jóvenes.

Tabla 28

TABLA 29

TABLA 30

La concentración de testosterona sanguínea **[T]** determinada en los cerdos prepúberes, no mostraron tener relación con el número de **CS** ($r<0.280$; $P>0.218$), ni con el **DTS** ($r<0.347$; $P>0.122$).

En el caso de las correlaciones realizadas entre las variables **DTS** (ambos testículos), **CS** (ambos testículos) con el peso de los testículos (**PTD**, **PTI**, **PTM**), con el **PV** y con la **[T]**, se identificó en los verracos jóvenes que el **DTS** no presentan correlación ($P>0.140$) con el número de **CS**, inclusive con la media (**Tabla 30**). Asimismo, el **DTS** no presenta una correlación ($P>0.05$) con el peso de ambos testículos, ni con el **PV**, como tampoco con la **[T]**. Asimismo el número de **CS** no mostró tampoco ninguna correlación con las variables antes señaladas.

Al realizar las comparaciones entre cerdos prepúberes y verracos jóvenes, se observa que la relación que presentan en la primera etapa analizada, los **DTS** y el peso de los testículos, no se observó en los verracos jóvenes. Lo cual puede señalar que los verracos a partir de los siete meses no cambian la relación entre el peso de los testículos y el diámetro de los túbulos seminíferos.

4.8. Concentración de Mineral en Tejidos de Cerdos Prepúberes y Verracos Jóvenes.

En este apartado se muestran los resultados encontrados sobre el efecto del consumo de **Zn** aportado con diferentes fuentes y niveles sobre la retención de minerales en tejidos: epidídimo, bazo, páncreas, hígado, riñón y hueso (fémur) de cerdos prepúberes y verracos jóvenes.

4.8.1. Concentración Mineral en Bazos Obtenidos de Cerdos Prepúberes.

En la **Tabla 31**, se anotan los valores minerales (**Zn**, **Cu**, **Mn**, **Fe**, y **Mg**) analizados en el bazo de cerdos prepúberes tratados con diferentes fuentes y niveles de **Zn**. Se observa que el **Zn** no fue afectado por el tratamiento ($P=0.113$) que consumieron los cerdos. La cantidad de **Zn** obtenida en el bazo fue de entre 83.68ppm y 103.47ppm.

Por su parte **Cu** y **Mg** tampoco presentaron diferencias ($P=0.06$; $P=0.464$ respectivamente). Aunque el **Cu** mostró una tendencia estadística ($P=0.06$) a aumentar la concentración de este mineral, dicha relación se presenta en los tratamientos que

contenían las fuentes **ZnO** y **ZnMet**. En tanto que el contenido de **Cu** del tratamiento **Control** fue similar a los tratamientos con **ZnSO₄**.

Tabla 31. Medidas de mínimos cuadrados \pm error estándar de la concentración mineral en Bazo de cerdos prepúberes.

Tratamiento	n	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Control	3	100.42 \pm 1.38	4.24 \pm 0.11	1.85 \pm 0.05 ^{ab}	633.75 \pm 70.89 ^a	808.76 \pm 20.54
ZnSO ₄ 150	3	95.04 \pm 2.36	4.90 \pm 0.35	1.87 \pm 0.18 ^{ab}	679.12 \pm 64.47 ^a	881.02 \pm 45.63
ZnSO ₄ 200	3	83.68 \pm 2.47	4.32 \pm 0.20	1.48 \pm 0.20 ^b	408.07 \pm 38.15 ^b	844.37 \pm 58.77
ZnO 150	3	103.47 \pm 2.19	7.00 \pm 1.42	2.76 \pm 0.58 ^a	415.18 \pm 40.82 ^{ab}	941.66 \pm 61.11
ZnO 200	3	94.39 \pm 0.79	6.80 \pm 0.82	2.01 \pm 0.17 ^{ab}	672.27 \pm 52.19 ^a	865.00 \pm 12.75
ZnMet 150	3	97.79 \pm 1.38	5.67 \pm 0.77	2.58 \pm 0.24 ^{ab}	658.66 \pm 54.16 ^a	882.73 \pm 51.50
ZnMet 200	3	100.30 \pm 6.32	5.59 \pm 0.58	2.56 \pm 0.22 ^{ab}	635.53 \pm 55.98 ^a	946.02 \pm 38.30
P=F		0.113	0.06	0.017	0.033	0.464
EEM		4.63	0.67	0.27	72.31	51.50

n= número de cerdos analizados; Valores obtenidos en base húmeda.

Para el caso de la concentración de **Mg** en el bazo se observó que no existieron diferencias (**P=0.464**), reportando una concentración de este mineral de 808ppm a 946ppm.

El **Mn** y **Fe**, si mostraron diferencias (**P=0.017**; **P=0.033** respectivamente). El contenido de **Mn** en el bazo fue mayor en las fuentes **ZnO** y **ZnMet**. Es evidente que la fuente **ZnSO₄** produjo un decremento de la cantidad de **Mn** en el bazo, similar a la contenida en el tratamiento **Control**.

No obstante en el caso del **Fe**, la fuente **ZnSO₄** a niveles de 200ppm se comporta similar al **ZnO150**, ya que reducen la concentración de **Fe** en el bazo. En tanto que la fuente **ZnMet** se comporta igual al **Control** y al **ZnSO₄150**.

En la **Tabla 32**, se observó una correlación positiva altamente significativa (**P<0.0067**) entre el **Zn** y **Cu**, **Mn**, **Fe** y **Mg**. Lo cual se puede relaciona con el hecho de que al aumentar el contenido de **Zn** (ppm) en el bazo también se aumenta el contenido del resto de minerales evaluados, no importando la fuente o el nivel de **Zn** contenido en el pienso de los cerdos prepúberes.

Tabla 32. Correlaciones (r) entre minerales contenidos en el Bazo de cerdos prepúberes.

	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Zn					
P=F	1.000	0.593 0.0003	0.611 0.0002	0.469 0.0067	0.649 <0.0001
Cu	0.593 0.0003				
P=F		1.000	0.578 0.0005	0.149 0.4148	0.680 <0.0001
Mn	0.611 0.0002	0.578 0.0005			
P=F			1.000	0.272 0.1315	0.428 0.0145
Fe	0.469 0.0067	0.149 0.4148	0.272 0.1315		
P=F				1.000	0.040 0.8260
Mg	0.649 <0.0001	0.680 <0.0001	0.428 0.0145	0.040 0.8260	
P=F					1.000

4.8.2. Concentración Mineral en Páncreas Obtenidos de Cerdos Prepúberes.

En el páncreas se observó que se redujo significativamente ($P<0.0001$) el contenido de **Zn** (Tabla 33), al utilizar el tratamiento **Control** (81.26ppm). Asimismo, se observó que la fuente **ZnSO₄** se comportó diferente cuando se utilizó 150ppm (216.78ppm), ya que esta fuente aumento la concentración en prácticamente el doble del contenido de **Zn** en el páncreas de los animales alimentados con el tratamiento **ZnSO₄200** (110.59ppm).

Tabla 33. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de la concentración mineral en Páncreas de cerdos prepúberes.

Tratamiento	n	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Control	3	81.26 \pm 3.06 ^d	5.89 \pm 0.38	5.74 \pm 0.46 ^{ab}	67.70 \pm 2.11 ^{ab}	808.98 \pm 32.78 ^{bc}
ZnSO₄ 150	3	216.76 \pm 44.05 ^a	7.05 \pm 0.65	5.46 \pm 0.62 ^{ab}	74.96 \pm 12.96 ^{ab}	862.32 \pm 63.44 ^{abc}
ZnSO₄ 200	3	110.59 \pm 27.15 ^{cd}	6.05 \pm 0.41	5.09 \pm 0.21 ^b	78.93 \pm 4.10 ^{ab}	712.36 \pm 36.52 ^c
ZnO 150	3	199.76 \pm 10.02 ^a	7.00 \pm 0.37	7.44 \pm 0.67 ^a	62.89 \pm 3.24 ^b	861.74 \pm 12.01 ^{abc}
ZnO 200	3	145.90 \pm 1.28 ^{abcd}	6.27 \pm 0.43	5.28 \pm 0.25 ^{ab}	93.35 \pm 7.22 ^{ab}	965.98 \pm 11.39 ^a
ZnMet 150	3	164.38 \pm 5.89 ^{abc}	6.59 \pm 0.81	5.60 \pm 0.51 ^{ab}	73.76 \pm 7.12 ^{ab}	872.81 \pm 9.64 ^{ab}
ZnMet 200	3	119.91 \pm 11.27 ^{bcd}	6.10 \pm 0.57	5.34 \pm 0.63 ^{ab}	96.14 \pm 9.64 ^a	778.58 \pm 44.00 ^{bc}
P=F		<0.0001	0.652	0.034	0.009	<0.0001
EEM		18.70	0.54	0.50	6.99	34.14

n= número de cerdos analizados; Valores obtenidos en base húmeda.

El **Cu** por su parte no fue afectado por ningún tratamiento ($P=0.652$). Pero los minerales **Mn**, **Fe** y **Mg** mostraron diferencias que indican que los tratamientos afectan de forma distinta la concentración de cada mineral.

En el caso de las correlaciones (r) del contenido de **Zn** con el **Mn**, la cual se mostró positiva y a nivel del 35% ($P<0.0195$), en tanto que el **Cu** tuvo una correlación de

$r=0.43$ (Tabla 34). Por su parte el **Mg** mostro una correlación más estrecha ($r=0.63$). En estos casos se observó que en la medida que aumenta la concentración de **Zn** en el páncreas, también se incrementa la concentración de los minerales antes descritos.

Tabla 34. Correlaciones (r) entre minerales de Páncreas en cerdos prepúberes.

	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Zn P=F	1.000	0.432 0.0038	0.354 0.0195	0.050 0.7464	0.636 <0.0001
Cu P=F	0.432 0.0038	1.000	0.585 <0.0001	0.018 0.2368	0.464 0.0017
Mn P=F	0.354 0.0195	0.585 <0.0001	1.000	0.170 0.2747	0.424 0.0045
Fe P=F	0.050 0.7464	0.184 0.2368	0.170 0.2747	1.000	0.189 0.2240
Mg P=F	0.636 <0.0001	0.464 0.0017	0.424 0.0045	0.189 0.2240	1.000

Sin embargo, en el **Fe** no mostro tener ninguna relación con el **Zn**, ni con ninguno de los otros minerales analizados.

4.8.3. Concentración Mineral en Hígados Obtenidos de Cerdos Prepúberes.

El hígado de los cerdos prepúberes mostró que la concentración de **Zn** fue variable debido al tratamiento empleado ($P<0.0001$) (Tabla 35). Es evidente que la concentración de **Zn** en el hígado fue mayor al utilizar las fuentes **ZnO** y **ZnMet**.

Los valores de **Zn** en el hígado de los cerdos prepúberes que consumieron el pienso que no contenía **Zn** adicional, mostró valores menores a todos los tratamientos, pero su comportamiento fue similar ($P<0.0001$) al mostrado por los tratamientos que contenían **ZnSO₄**.

En el hígado solo se observó que el tratamiento no afecto el contenido de **Cu** ($P=0.140$). El intervalo de valor de este mineral fue muy estrecho (21.29 a 28.04 ppm de **Cu**).

Tabla 35. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de la concentración mineral en Hígados de cerdos prepúberes.

Tratamiento	n	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Control	3	149.78 \pm 16.73 ^c	21.52 \pm 7.01	10.72 \pm 0.72 ^a	518.86 \pm 46.96 ^{ab}	886.62 \pm 66.16 ^a
ZnSO ₄ 150	3	196.50 \pm 32.54 ^{bc}	21.29 \pm 4.85	7.51 \pm 1.35 ^{ab}	309.09 \pm 54.81 ^b	665.54 \pm 67.83 ^{ab}
ZnSO ₄ 200	3	161.87 \pm 20.55 ^c	25.47 \pm 3.57	5.41 \pm 0.87 ^b	638.88 \pm 128.47 ^a	591.83 \pm 81.45 ^{ab}
ZnO 150	3	294.65 \pm 12.09 ^a	27.14 \pm 2.25	8.86 \pm 0.75 ^{ab}	369.97 \pm 32.62 ^{ab}	770.26 \pm 61.96 ^{ab}
ZnO 200	3	235.16 \pm 9.88 ^{abc}	25.61 \pm 1.22	7.08 \pm 0.61 ^{ab}	459.55 \pm 52.34 ^{ab}	742.86 \pm 50.22 ^{ab}
ZnMet 150	3	282.54.54 \pm 26.53 ^{ab}	28.04 \pm 3.69	9.20 \pm 0.70 ^{ab}	397.79 \pm 41.80 ^{ab}	698.74 \pm 85.22 ^{ab}
ZnMet 200	3	203.83 \pm 24.05 ^{abc}	23.66 \pm 2.96	6.13 \pm 0.64 ^b	554.13 \pm 56.89 ^{ab}	512.08 \pm 95.84 ^b
P=F		<0.0001	0.140	0.001	0.016	0.025
EEM		22.29	4.00	0.87	69.39	76.77

n= número de cerdos analizados; Valores obtenidos en base húmeda.

Por su parte el **Mn**, **Fe** y **Mg**, si mostraron estar afectados por los tratamientos suministrados. El contenido de **Mn** indicó que el tratamiento **Control** permitió que el hígado mantuviera concentraciones de este mineral superiores al resto de tratamientos. Se observó que las fuentes **ZnSO₄** y **ZnMet** produjeron una reducción de **Mn** en el hígado.

En el caso del **Fe**, se puede señalar que el tratamiento **ZnSO₄150** redujo en ~50% el contenido de este mineral en el hígado. El resto de tratamientos tuvieron un comportamiento similar (**P=0.016**). Asimismo, el **Mg** fue afectado positivamente por el tratamiento **Control**, ya que este indujo una concentración mayor de este mineral en el hígado (886.62ppm).

Tabla 36. Correlaciones (r) entre los minerales analizados en el Hígado de cerdos prepúberes.

	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Zn					
P=F	1.000	0.479	0.468	-0.107	0.490
Cu	0.479		0.690	-0.011	0.674
P=F	0.0003	1.000	<0.0001	0.935	<0.0001
Mn	0.468	0.690		-0.056	0.670
P=F	0.0004	<0.0001	1.000	0.6903	<0.0001
Fe	-0.107	-0.011	-0.056		-0.011
P=F	0.445	0.935	0.690	1.000	0.932
Mg	0.490	0.674	0.670	-0.011	
P=F	0.0002	<0.0001	<0.0001	0.932	1.000

La evaluación de la correlación (r) se puede observar en la **Tabla 36**. La correlación entre **Zn** y los minerales **Cu**, **Mn**, **Fe** y **Mg** en el hígado, demostró una correlación de al menos el 47% en todos los minerales analizados. Excepto el **Fe**, que no presenta ninguna relación con la concentración mineral de **Zn**, **Cu**, **Mn** y **Mg** ($P>0.445$).

4.8.4. Concentración Mineral en Riñones Obtenidos de Cerdos Prepúberes.

La concentración de **Zn** en riñón fue diferente ($P<0.0001$) debido al efecto de los tratamientos. Se observó que los tratamientos que contenían **ZnSO₄** en sus dos niveles, estaban en cantidades superiores al resto de los tratamientos, en particular estas diferencias fueron más acentuadas con el **ZnO** (ambos niveles) y con el tratamiento Control. Por su parte los tratamientos con **ZnMet** mostraron estar en las mismas concentraciones que los tratamientos de la fuente azufrada.

En el caso del **Cu**, este se mostró con amplias diferencias entre los tratamientos ($P<0.0001$). La cantidad de **Cu** encontrada en el riñón fue mayor en los tratamientos con azufre. De la misma manera la fuente **ZnO** fue quien menos Cu presento en el riñón.

A pesar de las diferencias encontradas en el **Zn** y el **Cu**, el **Mn** no mostró diferencia alguna ($P=0.183$) en su presencia en el riño, debida al tratamiento. **Tabla 37**.

Tabla 37. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de la Concentración mineral en Riñón de cerdos prepúberes.

Tratamiento	n	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Control	5	78.32 \pm 1.99 ^c	16.45 \pm 1.27 ^{cd}	4.14 \pm 0.40	184.85 \pm 13.14 ^{bc}	776.85 \pm 39.74 ^a
ZnSO ₄ 150	5	100.02 \pm 3.82 ^a	25.59 \pm 1.94 ^{abc}	4.98 \pm 0.29	164.75 \pm 4.68 ^c	782.28 \pm 29.08 ^a
ZnSO ₄ 200	5	106.34 \pm 3.53 ^a	31.19 \pm 2.73 ^a	4.69 \pm 0.25	277.85 \pm 8.58 ^a	714.81 \pm 26.058 ^{ab}
ZnO 150	5	81.34 \pm 2.85 ^c	18.07 \pm 1.37 ^{cd}	4.25 \pm 0.12	224.17 \pm 10.25 ^b	763.85 \pm 32.95 ^a
ZnO 200	5	76.51 \pm 1.26 ^c	14.78 \pm 1.32 ^d	4.36 \pm 0.26	164.99 \pm 13.32 ^c	645.755 \pm 38.05 ^{ab}
ZnMet 150	5	88.43 \pm 3.17 ^{ab}	19.55 \pm 3.13 ^{bcd}	4.85 \pm 0.06	210.47 \pm 6.04 ^b	677.40 \pm 15.49 ^{ab}
ZnMet 200	5	99.28 \pm 5.57 ^{ab}	27.48 \pm 1.46 ^{ab}	4.83 \pm 0.18	217.92 \pm 6.64 ^b	617.75 \pm 35.49 ^b
P=F		<0.0001	<0.0001	0.183	<0.0001	0.002
EEM		3.5	2.12	0.26	9.61	32.33

n= número de cerdos analizados; Valores obtenidos en base húmeda.

Los valores de **Mg** por su parte mostraron que eran inferiores los que presentaban la fuente **ZnO** y la orgánica **ZnMet**, lo cual permitió mostrar diferencias significativas ($P=0.002$). Esto evidencia un mayor contenido de **Mg** debido a la fuente azufrada y al tratamiento **Control**.

En el caso de las correlaciones (**Tabla 38**) del **Zn** con los minerales estudiados, se muestra que la relación que guarda con todos está por arriba del 40%. En cambio la relación del **Zn** con el **Cu** se muestra más estrecha ($r=0.810$; $P<0.0001$).

Tabla 38. Correlaciones (r) entre minerales de Riñón en cerdos prepúberes.

	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Zn	1.000	0.810	0.509	0.409	0.184
P=F		<0.0001	0.0006	0.007	0.241
Cu	0.810	1.000	0.288	0.460	0.055
P=F	<0.0001		0.064	0.002	0.726
Mn	0.509	0.288	1.000	0.242	0.297
P=F	0.0006	0.064		0.121	0.061
Fe	0.409	0.460	0.242	1.000	-0.002
P=F	0.007	0.002	0.121		0.986
Mg	0.184	0.055	0.297	-0.002	1.000
P=F	0.241	0.726	0.055	0.986	

4.8.5. Concentración Mineral en Hueso (Fémur) Obtenidos de Cerdos Prepúberes y Verracos Jóvenes.

En la **Tabla 39**, se observan los valores de concentración de minerales, tanto para cerdos prepúberes, como para verracos jóvenes.

En el caso de los cerdos prepúberes, los valores de **Zn** en el hueso no se comportaron de forma diferente entre los tratamientos aplicados en este estudio ($P=0.457$). El contenido de **Zn** en el hueso en el tratamiento **Control**, no fue distinto del resto de tratamientos que en su caso incluían 150ppm o 200ppm de **Zn**. Inclusive se puede señalar que el **Control** tuvo valores similares al **ZnMet200**.

En cuanto el **Cu** ($P=0.077$), **Mn** ($P=0.336$) y **Mg** ($P=0.592$) tampoco se mostró diferencia entre los tratamientos. Sin embargo, el **Fe** arrojó valores de concentración diferentes ($P<0.0001$) debidas al efecto del tratamiento. La menor cantidad de **Fe** se obtuvo en la fuente **ZnSO₄200** (4.30ppm), en tanto que los valores más altos estuvieron en **ZnMet150** (11.61ppm). No obstante estas diferencias no hay un comportamiento claro con respecto a que fuente o nivel produce mayores concentraciones de **Fe**, lo que se puede señalar es que la cantidad de **Fe** fue más alta en los huesos de los cerdos prepúberes alimentados con **ZnMet**.

RESULTADOS

Tabla 39. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de la concentración mineral en Huesos de cerdos prepúberes y verracos jóvenes.

Tratamiento	Cerdo Prepúber					
	n=	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Control	3	208.64 \pm 33.24	8.45 \pm 0.36	4.47 \pm 0.48	6.54 \pm 0.83 ^{bc}	5469.13 \pm 357.88
ZnSO ₄ 150	3	199.86 \pm 2.69	8.17 \pm 0.27	3.81 \pm 0.07	11.12 \pm 0.85 ^a	5098.91 \pm 74.98
ZnSO ₄ 200	3	217.89 \pm 10.91	10.72 \pm 1.17	4.59 \pm 0.50	4.30 \pm 0.68 ^c	5870.00 \pm 364.78
ZnO 150	3	222.34 \pm 11.53	8.53 \pm 0.37	4.51 \pm 0.35	5.53 \pm 0.24 ^c	5312.76 \pm 306.55
ZnO 200	3	188.88 \pm 5.34	8.68 \pm 0.56	5.12 \pm 0.50	8.04 \pm 0.92 ^{abc}	5584.26 \pm 220.00
ZnMet 150	3	292.43 \pm 91.86	9.28 \pm 0.42	4.88 \pm 0.54	11.61 \pm 1.99 ^a	5743.17 \pm 467.85
ZnMet 200	3	208.09 \pm 7.77	9.99 \pm 0.45	4.04 \pm 0.02	10.23 \pm 0.65 ^{ab}	5569.82 \pm 291.99
P=F		0.457	0.077	0.336	<.0001	0.692
EEM		32.84	0.64	0.41	0.94	318.80

Tratamiento	Verracos Jóvenes					
	n=	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Control	5	174.93 \pm 7.48 ^b	8.74 \pm 0.46	5.14 \pm 0.25	9.97 \pm 0.49 ^d	5913.70 \pm 134.03 ^a
ZnSO ₄ 150	5	191.35 \pm 8.62 ^{ab}	8.42 \pm 0.70	4.54 \pm 0.30	13.39 \pm 1.06 ^{bcd}	5026.62 \pm 161.90 ^b
ZnSO ₄ 200	5	212.11 \pm 6.64 ^a	9.47 \pm 0.35	5.14 \pm 0.18	21.20 \pm 0.81 ^a	5946.01 \pm 128.84 ^a
ZnO 150	5	208.22 \pm 8.92 ^a	9.44 \pm 0.32	5.39 \pm 0.19	16.68 \pm 1.22 ^b	5958.13 \pm 146.26 ^a
ZnO 200	5	196.69 \pm 4.24 ^{ab}	9.71 \pm 0.42	5.33 \pm 0.16	10.87 \pm 0.56 ^{cd}	5818.69 \pm 169.49 ^a
ZnMet 150	5	189.07 \pm 7.81 ^{ab}	8.55 \pm 0.41	4.91 \pm 0.21	14.52 \pm 0.66 ^{bc}	5891.56 \pm 164.57 ^a
ZnMet 200	5	187.46 \pm 4.55 ^{ab}	9.39 \pm 0.33	5.24 \pm 0.21	13.06 \pm 1.20 ^{bcd}	6052.01 \pm 150.47 ^a
P=F		0.004	0.243	0.154	<0.0001	0.0002
EEM		7.351	0.442	0.223	0.917	152.448

n= número de cerdos analizados; Valores obtenidos en base húmeda.

Por su parte las correlaciones realizadas (Tabla 40) para evaluar la relación entre **Zn** y los demás minerales estudiados, mostraron que con **Cu** y **Fe** no existe ninguna ($P>0.05$). En tanto que con **Mn** ($P=0.030$) y **Mg** ($P=0.010$) la relación es positiva, pero aun y cuando es significativa, es baja ($r<0.44$). EL **Cu** también mostró una correlación positiva con **Mg** ($r=0.441$). Sin embargo, quien tiene mayor correlación positiva fue el **Mn** con el **Mg** ($r=0.764$) lo cual indica que ambos minerales estarán estrechamente relacionados y en concentraciones altas en el hueso.

A diferencia de los cerdos prepúberes, el hueso de los verracos jóvenes mostro diferencia ($P=0.004$) en el contenido de **Zn** (Tabla 39).

El tratamiento **Control** presento los niveles más bajos de **Zn** contenido en el hueso. El resto de tratamientos se comportó igual ($P=0.004$). No existe un efecto distintivo con respecto a la fuente de **Zn** empleada en el pienso, pero se observa que la concentración de **Zn** fue menor en los tratamientos con **Zn** orgánico.

Tabla 40. Correlaciones (r) entre minerales de Huesos en cerdos prepúberes.

	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Zn	1.000	0.137	0.383	0.127	0.445
P=F		0.452	0.030	0.488	0.010
Cu	0.137	1.000	0.335	-0.105	0.441
P=F	0.452		0.060	0.564	0.011
Mn	0.383	0.335	1.000	-0.054	0.764
P=F	0.030	0.060		0.768	<0.0001
Fe	0.127	-0.105	-0.054	1.000	0.048
P=F	0.488	0.5640	0.7686		0.792
Mg	0.445	0.441	0.764	0.048	1.000
P=F	0.010	0.011	<0.0001	0.792	

En el caso del **Cu** y **Mn** no existieron diferencias ($P>0.05$), pero en **Fe** ($P<0.0001$) y **Mg** ($P=0.0002$) sí estuvo presente un efecto distinto de los tratamientos aplicados en el hueso. El tratamiento **Control** fue quien menor concentración de **Fe** mostró (9.97ppm), y el **ZnSO₄200** el de mayor concentración (21.20ppm).

En general se puede señalar que los valores de **Fe**, no identifican a una fuente o nivel en particular que pueda mejorar el contenido de este mineral en el hueso, pero se puede resaltar que los tratamientos con **ZnMet** en sus dos niveles, mostraron un comportamiento más homogéneo.

Por su parte el **Mg**, mostro que el tratamiento **ZnSO₄150** ejerció un efecto significativamente negativo, ya que al menos afecto el contenido de este mineral en el hueso en un 15%.

El grado de correlación que el **Zn** mostró con el resto de minerales analizados, indican que son significativos ($P<0.05$) pero con mediana estreches, ninguna correlación supera el 43%.

Tabla 41. Correlación (r) entre minerales contenidos en Huesos de verracos jóvenes.

	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Zn	1.000	0.336	0.322	0.433	0.359
P=F		0.0001	0.0002	<0.0001	<0.0001
Cu	0.336	1.000	0.535	0.216	0.531
P=F	0.0001		<0.0001	0.014	<0.0001
Mn	0.322	0.535	1.000	0.083	0.662
P=F	0.0002	<0.0001		0.349	<0.0001
Fe	0.433	0.216	0.083	1.000	0.144
P=F	<0.0001	0.014	0.349		0.104
Mg	0.359	0.531	0.662	0.144	1.000
P=F	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.104	

En el caso de los minerales **Cu**, **Mn**, **Fe** y **Mg**, también se mostró una correlación positiva entre ellos (**Tabla 41**). En particular el **Mn** con el **Cu** y el **Mg**, siendo los valores de correlación superiores a 50%.

4.8.6. Concentración Mineral en Testículos obtenidos de Cerdos Prepúberes y Verracos Jóvenes.

Los valores encontrados de **Zn** en los testículos obtenidos de cerdos prepúberes, mostraron que no existe efecto del tratamiento (**P=0.556**). Los valores fueron de 78.19ppm a 95.67ppm de **Zn**. A pesar de que el contenido de **Zn** en el **Control** fue menor (78.19ppm) al del resto de tratamientos, esto no evidencia diferencias estadísticas. Asimismo, se observa que el uso de 200ppm de **Zn** con cualquiera de las fuentes, esto aumenta el contenido del mineral en los testículos, en aproximadamente 5ppm a 11ppm.

Tabla 42. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de la concentración mineral de Testículos en cerdos prepúberes y verracos jóvenes.

Tratamiento	Cerdo Prepúber					
	n	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Control	3	78.19 \pm 0.90	7.26 \pm 1.62	2.09 \pm 0.16 ^{ab}	114.20 \pm 9.28 ^b	702.40 \pm 25.76 ^a
ZnSO ₄ 150	3	81.85 \pm 3.24	5.28 \pm 0.11	1.76 \pm 0.03 ^b	92.30 \pm 9.03 ^b	728.86 \pm 29.50 ^a
ZnSO ₄ 200	3	91.66 \pm 2.94	6.70 \pm 1.52	3.25 \pm 0.25 ^a	204.39 \pm 42.01 ^a	709.72 \pm 24.19 ^a
ZnO 150	3	82.34 \pm 3.50	5.34 \pm 0.86	2.84 \pm 0.33 ^{ab}	143.74 \pm 13.07 ^{ab}	677.25 \pm 16.23 ^{ab}
ZnO 200	3	87.08 \pm 8.29	9.80 \pm 2.13	1.96 \pm 0.14 ^b	107.24 \pm 4.45 ^b	571.14 \pm 35.87 ^b
ZnMet 150	3	84.18 \pm 4.80	9.31 \pm 1.22	1.91 \pm 0.16 ^b	106.33 \pm 9.76 ^b	687.18 \pm 20.72 ^{ab}
ZnMet 200	3	95.67 \pm 13.46	6.91 \pm 0.90	2.28 \pm 0.49 ^{ab}	111.44 \pm 6.38 ^b	668.48 \pm 27.44 ^{ab}
P=F		0.556	0.187	0.012	0.009	0.018
EEM		0.03	0.89	22.95	0.004	0.002
	Verracos Jóvenes					
	n	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Control	5	79.64 \pm 3.22	9.38 \pm 0.62 ^a	1.98 \pm 0.11	106.60 \pm 5.73	701.93 \pm 25.23
ZnSO ₄ 150	5	85.44 \pm 1.35	5.20 \pm 0.29 ^{cd}	1.90 \pm 0.06	97.62 \pm 3.57	692.53 \pm 20.03
ZnSO ₄ 200	5	84.32 \pm 1.56	6.11 \pm 0.45 ^{bcd}	2.23 \pm 0.14	94.04 \pm 2.55	680.62 \pm 17.05
ZnO 150	5	83.22 \pm 2.63	4.70 \pm 0.39 ^d	2.31 \pm 0.14	93.41 \pm 2.25	671.43 \pm 16.89
ZnO 200	5	81.82 \pm 2.58	5.21 \pm 0.18 ^{cd}	1.88 \pm 0.09	101.65 \pm 1.43	713.73 \pm 31.01
ZnMet 150	5	84.84 \pm 1.89	7.61 \pm 0.49 ^{ab}	1.88 \pm 0.07	94.32 \pm 1.88	682.99 \pm 19.48
ZnMet 200	5	86.76 \pm 2.18	7.07 \pm 0.68 ^{bc}	1.84 \pm 0.08	96.93 \pm 2.71	655.50 \pm 20.09
P=F		0.375	<0.0001	0.06	0.09	0.614
EEM		2.28	0.47	0.46	3.19	22.06

n= número de cerdos analizados; Valores obtenidos en base húmeda.

En cuanto al **Cu**, este mineral se mostró en cantidades iguales en todos los tratamientos. Pero el **Mn** ($P=0.012$), **Fe** ($P=0.009$) y **Mg** ($P=0.018$) tuvieron valores distintos por efecto del tratamiento.

Al analizar las correlaciones existentes entre el **Zn** con el resto de minerales evaluados (**Tabla 42**), se observó que no existe ninguna. Los minerales se comportan de forma independiente, y su concentración en el testículo es debido al efecto del tratamiento, más que las posibles correlaciones que existan entre ellos.

El único mineral que en los tejidos testiculares de cerdos prepúberes parece tener una relación es el **Fe** con el **Mn** ($r=0.75$; $P<0.0001$), lo que supone que al aumentar el **Fe** en el testículo, sugiere un aumento del **Mn** también (**Tabla 43**). Este efecto se observó en todas las fuentes de **Zn** estudiadas, inclusive en el tratamiento **Control**.

Los niveles de **Zn** encontrados en los testículos de los verracos jóvenes (**Tabla 42**) no mostraron diferencias entre los tratamientos aplicados ($P=0.375$), y se mantuvieron en un intervalo de valor de 79.64ppm a 86.76ppm.

Para el caso del **Cu**, si fue identificado el efecto distinto entre los tratamientos ($P<0.0001$). El tratamiento **Control** tuvo los valores más altos (9.38ppm) en tanto que el resto de tratamientos tuvieron valores de entre 4.70ppm a 7.61ppm. Se identificó además que el **Cu** presente en los testículos, estaba favorecido por los tratamientos que utilizaron **ZnMet**.

Tabla 43. Correlaciones (r) entre minerales de Testículo en cerdos prepúberes.

	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Zn	1.000	0.222	0.134	0.294	-0.132
P=F		0.332	0.559	0.195	0.568
Cu	0.222	1.000	-0.027	-0.114	-0.406
P=F	0.332		0.906	0.622	0.070
Mn	0.134	-0.027	1.000	0.754	0.200
P=F	0.559	0.906		<0.0001	0.383
Fe	0.294	-0.114	0.754	1.000	0.124
P=F	0.195	0.622	<0.0001		0.589
Mg	-0.13208	-0.40673	0.20035	0.12484	1.000
P=F	0.5682	0.070	0.3839	0.5898	

Tabla 44. Correlaciones (r) entre minerales de Testículo en verracos jóvenes.

	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Zn	1.000	0.205	0.049	0.034	0.362
P=F		0.026	0.597	0.712	<0.0001
Cu	0.493	1.000	-0.041	0.217	0.149
P=F	0.0261		0.659	0.018	0.107
Mn	0.049	-0.041	1.000	0.141	0.299
P=F	0.597	0.659		0.128	0.109
Fe	0.034	0.217	0.141	1.000	0.281
P=F	0.712	0.018	0.128		0.002
Mg	0.362	0.149	0.148	0.281	1.000
P=F	<0.0001	0.107	0.109	0.002	

El **Zn**, al relacionarlo con **Cu**, **Mn**, **Fe** y **Mg**, mostro una reducida correlación con el **Cu** y **Mg**. No obstante que las correlaciones existieron entre el **Zn**, **Cu** y **Mg** estas fueron por debajo de 36% (**Tabla 44**).

El resto de minerales estudiados no mostró diferencias en su concentración testicular, por efecto de los tratamientos aplicados.

4.8.7. Concentración Mineral en Epidídimos obtenidos de Cerdos Prepúberes y Verracos Jóvenes.

En la **Tabla 45**, se observan los valores obtenidos por espectrofotometría de absorción atómica sobre el contenido mineral (**Zn**, **Cu**, **Mn**, **Fe** y **Mg**) del epidídimo de los cerdos prepúberes por tratamiento, donde se puede observar que no existieron diferencias (**P>0.05**) entre tratamientos respecto a la concentración mineral de ninguna de las variables analizadas.

Los intervalos de valor observados para la concentración mineral de **Zn** indican que la cantidad encontrada en epidídimo va desde 50.77ppm a 75.42ppm. Dichos valores corresponden a los tratamientos que contenían **Zn** adicional en el pienso de los cerdos prepúberes.

Tabla 45. Media de mínimos cuadrados \pm error estándar de la concentración mineral en Epidídimo de cerdos prepúberes y verracos jóvenes.

Tratamiento	Cerdo Prepúber					
	n	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Control	3	65.10 \pm 5.20	4.64 \pm 0.87	1.49 \pm 0.26	51.75 \pm 7.03	362.18 \pm 65.22
ZnSO ₄ 150	3	63.79 \pm 5.90	4.38 \pm 0.68	1.75 \pm 0.21	46.13 \pm 9.11	422.06 \pm 54.27
ZnSO ₄ 200	3	50.77 \pm 5.96	3.64 \pm 1.10	1.86 \pm 0.74	55.20 \pm 3.49	339.28 \pm 35.84
ZnO 150	3	69.15 \pm 11.97	2.91 \pm 0.72	2.61 \pm 0.63	53.47 \pm 6.21	476.16 \pm 51.05
ZnO 200	3	77.15 \pm 5.87	6.52 \pm 2.07	2.55 \pm 0.09	72.26 \pm 6.19	487.77 \pm 62.41
ZnMet 150	3	75.42 \pm 14.95	5.97 \pm 1.28	2.32 \pm 0.25	70.92 \pm 14.84	457.70 \pm 32.93
ZnMet 200	3	73.05 \pm 9.33	4.61 \pm 1.12	2.43 \pm 0.46	59.69 \pm 3.16	424.02 \pm 11.85
P=F		0.468	0.399	0.366	0.314	0.481
EEM		8.91	1.15	0.41	9.26	55.35
	Verracos Jóvenes					
	n	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Control	5	68.14 \pm 2.77 ^a	5.66 \pm 0.36 ^a	2.26 \pm 0.19	55.97 \pm 2.72	459.12 \pm 25.24
ZnSO ₄ 150	5	58.83 \pm 3.14 ^{ab}	3.77 \pm 0.40 ^{bc}	2.35 \pm 0.19	48.08 \pm 2.75	425.76 \pm 122.23
ZnSO ₄ 200	5	54.26 \pm 3.16 ^b	2.31 \pm 0.16 ^c	2.19 \pm 0.23	52.18 \pm 2.46	373.98 \pm 15.87
ZnO 150	5	56.78 \pm 2.20 ^{ab}	2.45 \pm 0.21 ^c	2.20 \pm 0.17	52.10 \pm 2.65	436.98 \pm 18.44
ZnO 200	5	54.27 \pm 3.70 ^b	3.34 \pm 0.30 ^{bc}	2.60 \pm 0.22	58.25 \pm 2.09	463.70 \pm 18.98
ZnMet 150	5	50.58 \pm 3.14 ^b	4.14 \pm 0.49 ^b	2.78 \pm 0.23	55.19 \pm 12.68	430.98 \pm 15.55
ZnMet 200	5	63.14 \pm 3.09 ^{ab}	3.12 \pm 0.30 ^{bc}	1.91 \pm 0.09	50.00 \pm 2.49	450.18 \pm 36.39
P=F		0.002	<.0001	0.067	0.853	0.100
EEM		3.17	0.34	0.20	5.54	23.14

n= número de cerdos analizados; Valores obtenidos en base húmeda.

Para el caso del contenido de **Zn** epididimario de los cerdos prepúberes que recibieron el pienso Control se encontraron valores de 65.10ppm de **Zn**.

Con respecto al contenido de **Cu**, se observó que la cantidad de este mineral en el epidídimo se encontraba entre 2.91ppm (**ZnO150**) a 6.52ppm (**ZnO200**). Coincidentemente estas diferencias de valores se encontraron en los tejidos de los animales que consumieron los tratamientos que contenían **ZnO**.

Al analizar las correlaciones existentes entre los minerales evaluados en el epidídimo de los cerdos prepúberes (**Tabla 46**), se observó que el **Zn** tiene una alta correlación positiva ($r > 0.51$; $P < 0.009$) con el **Cu**, **Mn** y **Mg**. Lo cual permite señalar que en la medida que se aumenta la cantidad (ppm) de **Zn** contenido en el epidídimo, se observa un incremento de los minerales antes señalados en este órgano. Este comportamiento, no fue observado con respecto a la concentración de **Fe** ($r = 0.308$; $P = 0.142$).

Tabla 46. Correlaciones (r) entre las concentraciones de minerales analizados en Epidídimo de cerdos prepúberes.

	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Zn	1.000	0.593	0.518	0.308	0.685
P=F		0.002	0.009	0.142	0.0002
Cu	0.593	1.000	0.359	0.468	0.688
P=F	0.0022		0.084	0.021	0.0002
Mn	0.518	0.359	1.000	0.497	0.521
P=F	0.009	0.084		0.013	0.009
Fe	0.308	0.468	0.497	1.000	0.350
P=F	0.142	0.201	0.013		0.093
Mg	0.685	0.688	0.521	0.350	1.000
P=F	0.0002	0.0002	0.009	0.093	

Los tratamientos que contuvieron mayor cantidad de **Zn** en el epidídimo fueron los **Metionatos** y los **Óxidos** (Tabla 45) lo cual indica que estas fuentes permiten aumentar la concentración de **Cu**, **Mn** y **Mg** en el epidídimo de los animales prepúberes.

Los valores de **Zn** en el epidídimo de verracos jóvenes (Tabla 45), mostraron diferencia entre tratamientos (**P=0.002**). Encontrando que los valores más altos fueron obtenidos por el tratamiento **Control** (68.14ppm), en tanto que los tratamientos que contuvieron alguna fuente **Zn** estuvieron por debajo de las 60ppm.

Así también se comportó el **Cu** en el epidídimo de los verracos jóvenes, ya que se observó que la mayor concentración de este mineral la mostró el **Control** (5.66ppm).

El resto de minerales analizados no indicó efecto de tratamiento (**P>0.05**), por lo que se comportaron de forma homogénea.

Tabla 47. Correlaciones (r) entre minerales de Epidídimo en verracos jóvenes.

	Zn	Cu	Mn	Fe	Mg
Zn	1.000	0.407	0.018	-0.008	0.312
P=F		<0.0001	0.7952	0.9009	<0.0001
Cu	0.407	1.000	0.337	0.231	0.385
P=F	<0.0001		<0.0001	0.001	<0.0001
Mn	0.018	0.337	1.000	0.191	0.299
P=F	0.795	<0.0001		0.007	<0.0001
Fe	-0.008	0.231	0.191	1.000	0.1685
P=F	0.900	0.001	0.007		0.018
Mg	0.312	0.385	0.299	0.168	1.000
P=F	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.018	

La correlación observada del **Zn** con el resto de minerales estudiados, demuestra que si bien son significativas ($P<0.0001$) con el **Cu** ($r=0.407$) y con el **Mg** ($r=0.312$) los valores no son amplios. Caso similar guarda la relación significativa del **Cu** con **Mn**, **Fe** y **Mg**, todas estas por debajo del 38% (Tabla 47).

4.8.8. Concentración de Zn en Plasma Sanguíneo de Cerdos Prepúberes y Verracos Jóvenes.

En la valoración de la concentración de **Zn** en plasma sanguíneo, los cerdos prepúberes presentaron una concentración de **Zn** igual en todos los tratamientos ($P=0.381$). Los valores estuvieron en el orden de 0.738mg mL^{-1} a 1.131mg L^{-1} en cerdos prepúberes, en tanto que en verracos jóvenes los valores se mantuvieron entre 0.813mg L^{-1} a 1.039mg L^{-1} .

Tabla 48. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de la concentración de Zn en plasma Sanguíneo (mg mL^{-1}) en cerdos prepúberes y verracos jóvenes.

Tratamientos	Cerdos Prepúberes		Verracos Jóvenes	
	n	Zn en Plasma Sanguíneo mg mL^{-1}	n	Zn en Plasma Sanguíneo mg mL^{-1}
Control	7	0.893 ± 0.110	5	0.848 ± 0.089
ZnSO ₄ 150	7	1.131 ± 0.192	5	0.839 ± 0.090
ZnSO ₄ 200	7	0.833 ± 0.079	5	1.034 ± 0.095
Zn0150	7	0.967 ± 0.148	5	0.861 ± 0.054
Zn0200	7	0.817 ± 0.110	5	0.813 ± 0.064
ZnMet150	7	0.738 ± 0.078	5	0.902 ± 0.076
ZnMet200	7	0.968 ± 0.123	5	0.858 ± 0.067
EEM		0.128		0.079
P=F		0.381		0.087

Estos últimos resultados muestran que las diferencias en el plasma sanguíneo de los verracos jóvenes tratados, fueron más pequeños (0.226mg L^{-1}) por ello en estos animales se identifica una tendencia ($P=0.079$) a señalar que el utilizar una fuente de **Zn** puede llegar a aumentar el contenido del mineral en el plasma sanguíneo. No así, el nivel de **Zn** en el pienso.

4.9. Evaluación del Comportamiento durante el Entrenamiento de Verracos Jóvenes

Las variables evaluadas al momento de entrenar a los verracos se muestran en la Tabla 49, en ella se observa la intensidad de entrenamiento a la que fueron sometidos los verracos, para poder obtener una monta consistente sobre el maniquí, y con ello se obtuviera un eyaculado de calidad.

Con respecto a lo anterior, se puede señalar que existieron diferencias (**P=0.05**) en la intensidad de entrenamiento en los verracos de los distintos tratamientos aplicados en esta investigación. La mayor intensidad de entrenamiento no fue propia de alguna fuente o nivel de **Zn**, ya que se pudo observar que los verracos de todos los tratamientos fueron sometidos más de una vez por día a entrenamiento. No obstante, hay que destacar que la fuente con mayor intensidad de entrenamiento fue el **ZnSO₄** y el tratamiento **Control**.

En cuanto al número de entrenamientos que se dieron a los verracos para conseguir su total adecuación al trabajo rutinario de extracción seminal, se puede señalar que no se observó efecto del tratamiento (**P=0.156**), por lo que el número de entrenamientos fue estadísticamente igual para todos los verracos. Aunque de forma numérica se puede señalar que los tratamientos con fuente azufrada produjeron un mayor número de entrenamientos en los verracos. En particular el nivel de 200ppm de **Zn** se comportó igual que el tratamiento **Control**.

El entrenamiento además se realizó de forma tal que los verracos no se sometieron a una condición de estrés, por lo que se realizó el entrenamiento en las horas menos calurosas del día, y siempre observando el comportamiento y ánimo de los verracos. Con base en ello, se les dio un tiempo de descanso entre cada entrenamiento, el cual tuvo diferencias (**P=0.05**), siendo más amplio en los verracos del tratamiento **Zn-Met150**, ya que estos animales tuvieron mayor facilidad para mostrarse interesados en la monta del maniquí, en tanto los verracos del tratamiento **Control** y los de la fuente azufrada, fueron los que mayores dificultades tuvieron para montar el maniquí.

La mayor intensidad en el entrenamiento, y la reducción en el intervalo entre entrenamientos permitió que se redujeran los días de entrenamiento, en los tratamientos **Control** y **ZnSO₄200**, pero esto no paso con el tratamiento **ZnSO₄150**, ya que los verracos mostraron una renuencia a trabajar, originando un tiempo de entrenamiento mayor (67.60 días; **P=0.002**).

Si bien el tiempo para que los verracos produjeran un eyaculado una vez que se montaban en el maniquí, no fue distinto entre los tratamientos (**P=0.529**), sí se observó un intervalo de tiempo amplio (4.75min a 17.2min).

Tabla 49

RESULTADOS

Para conocer si existía algún grado de relación (**Tabla 50**) entre el tiempo que se ocupó para entrenar a los verracos (días de entrenamiento) y la concentración de Testosterona, se realizó un análisis de correlación (r), el cual indicó que no existía relación alguna ($r=0.011$; $P=0.956$). También, se realizó un análisis de correlación entre la concentración de testosterona y el tiempo para eyacular, sin observar relación alguna ($r=-0.229$; $P=0.185$).

TABLA 50. Correlación (r) entre la concentración de testosterona y los días de entrenamiento y el tiempo para eyacular.

	[Testosterona]	Tiempo para eyacular	Días de entrenamiento
[Testosterona] P=F	1.000	-0.229 0.185	0.011 0.956
Tiempo para eyacular P=F	-0.229 0.185	1.000	0.322 0.101
Días de entrenamiento P=F	0.011 0.956	0.322 0.101	1.000

5. DISCUSIÓN

Si bien se ha demostrado la influencia que tiene el **Zn** sobre el desarrollo reproductivo de los machos, aún existen algunas variables que no han sido suficientemente estimadas en el caso de los machos porcinos, por ello en esta investigación se pretende dar a conocer información específica sobre aquellas variables que nos puedan dar mayor explicación sobre el efecto que tiene la utilización de **Zn** en sus diferentes fuentes (**ZnSO₄**, **ZnO**, **ZnMet**) y niveles (**150ppm** y **200ppm**) sobre las características reproductivas de machos porcinos desde una edad prepúber hasta su vida reproductiva activa.

5.1. Consumo de Pienso en Cerdos Prepúberes

El **Consumo de Pienso Día⁻¹ (CPD)** de los machos prepúberes en los periodos de Crecimiento, Desarrollo y Finalización con relación al efecto de los micronutrientes no ha sido estudiado a profundidad y la literatura existente con respecto al uso y efecto de diferentes fuentes y niveles de minerales en machos no castrados es escasa y antigua. Sin embargo, es coincidente la información que indica que las necesidades cambian según el estado fisiológico de los animales, su situación anatomofisiológica (castrados o no), raza, salud, época e intensidad de trabajo (**Carlson y Boren, 2001; Lorenzo Bermejo et al., 2003; Studziński et al., 2006**).

Castellanos et al. (2013), señalan que los minerales se incluyen en los correctores de piensos, siendo común el uso de **Cu** y **Zn** como promotores de crecimiento o como tratamientos preventivos de enfermedades intestinales o dermatológicas, a niveles superiores a los que nutricionalmente son requeridos (2000 a 3000 **mg Kg⁻¹** de pienso). Desafortunadamente estos niveles pueden incidir directamente en el desarrollo de las células y en su integridad, produciendo posibles daños irreversibles. A pesar de que estos daños suelen no ser identificados con facilidad, puede observarse un **CPD** reducido, una baja ganancia de peso, así como resorción de **Zn** en el huesos, diarrea, daño pulmonar y digestivo (**Hussein et al., 2012**). Por su parte **García (2010)**, demostró que a nivel celular el **ADN** de los espermatozoides puede verse afectado cuando los niveles de **Zn** se incrementan hasta 200ppm. Lo cual puede equipararse a los estudios realizados por **Pimpanich et al. (2011)**, quienes señalan los efectos de utilizar un producto como el glicinato de **Zn (ZnGli)** como promotor de lisis de los tejidos testiculares (castración) causando un daño irreversible.

Para cumplir con el objetivo de identificar el efecto que se presenta al consumir diferentes fuentes y distintos niveles de **Zn** en el pienso de cerdos prepúberes, se incluyó la valoración del **CPD**, lo cual permitirá realizar cambios o ajustes en el aporte de nutrientes y suministro de pienso que favorezca el mantenimiento, rendimiento, así como costos de producción, determinando la ganancia de peso día^{-1} en el caso de los cerdos prepúberes y de los verracos jóvenes que iniciaran su actividad sexual para la colección de eyaculados.

Los resultados de esta investigación demostraron que no existió un efecto significativo de los tratamientos con respecto a la variable **CPD** en ninguno de los periodos evaluados, indicando que incluir **Zn** a través de una fuente orgánica o inorgánica no representa daños o beneficios significativos en los machos no castrados, por otra parte el nivel de inclusión a través de las fuentes antes señaladas no representa mejoras en el **CPD**.

Por otra parte se observó que existe un efecto individual importante (**Lorenzo Bermejo et al., 2003**), por lo que es recomendable invertir tiempo y esfuerzo para analizar el comportamiento de cada animal (**Von Felde et al., 1996**) que en un futuro será un cerdo con actividad sexual productiva.

Es importante señalar, que la valoración individualizada del **CPD** de los cerdos prepúberes, obtenida en esta investigación fue superior a las cantidades que señala **Campabadal (2009)** para las etapas de Crecimiento, ya que este autor muestra consumos de 1.8Kg en cerdos de 30 a 50Kg de **PV**. En tanto que los animales en etapa de Desarrollo consumen cantidades similares a las encontradas en esta investigación, sin embargo, los consumos son superiores en la etapa de Finalización. **Schulze et al. (2002)**, señalan que al final de la etapa de finalización los cerdos tienden a reducir el **CPD**.

La información publicada en 2004 por **van Heugten et al.**, concuerda con lo publicado por **Campabadal (2009)**, a pesar que en esa investigación se utilizaron piensos comerciales con niveles normales (155ppm, 142ppm, 135ppm) y limitados de **Zn** (75, 79, 80 ppm), considerando por tanto que reducir el nivel de **Zn** no afecta el rendimiento de los cerdos.

Estudios realizados por **Hernández et al. (2008)**, señalan que el **CPD** no se ve afectado, aun y cuando la fuente de **Zn** inorgánica se substituía por una orgánica, y que al utilizar diferentes niveles de **Zn** recomendados por la bibliografía, tampoco se afecta el comportamiento productivo de los cerdos durante la etapa de Crecimiento-Desarrollo.

Como ya se mencionó para el caso de esta investigación las diferencias no fueron significativas al analizar el **CPD**, pero se puede resaltar la existencia de tendencias estadísticas a incrementar el consumo de pienso en los cerdos del tratamiento **Control**. Por su parte, **Martin et al. (2011)**, señalan que lechones destetados suplementados con una fuente orgánica de **Zn (Prot-Zn)** aumentaron el consumo de pienso con respecto al tratamiento **Control** que no contenía suplemento de **Zn** (27 mg Kg^{-1}), para el caso de la comparación con fuentes orgánicas e inorgánicas con niveles diferentes de **Zn**, tampoco se observaron diferencias ($P > 0.05$). Lo cual, coincide con lo señalado por **van Heugten et al. (2003)**, quienes compararon el uso de una fuente inorgánica **ZnSO₄** (80 y 160 ppm) con dos fuentes orgánicas (**ZnMet y Zn-Lis**: 80 ppm), sin encontrar diferencias en el **CPD**, por lo que según estos autores el utilizar una fuente orgánica de **Zn** no mejora el rendimiento de los animales. Al comparar el rendimiento de cerdos en etapas de crecimiento-finalización alimentados con piensos que contenían una fuente orgánica (36ppm, 120ppm, 240ppm de **Zn**) y otros con una fuente inorgánica (36ppm, 120ppm, 240ppm de **Zn**) **Fremaut (2003)**, observó que la ganancia día^{-1} fue mayor en los animales que recibieron el suplemento con la fuente orgánica (36ppm y 120ppm **Zn**) en comparación con los animales que consumieron el pienso con los mismos niveles de **Zn** pero con una fuente inorgánica.

En trabajos realizados con cerdos destetados **Anh et al., (1998)**, encontraron que los cerdos alimentados con piensos que contenían **ZnMet** (100ppm y 200ppm) y **ZnO** (100ppm y 200ppm) presentaron diferencias ($P < 0.01$) entre tratamientos, siendo mayor el **CPD** al utilizar fuentes de **Zn** metionatadas y oxidadas, estas últimas a niveles de 100ppm, señalando que la interacción entre fuente y nivel no fue significativa ($P < 0.05$).

Por su parte **Paik et al. (2000)**, observaron que la fuente metionatada a niveles de 100ppm y 200ppm producía un aumento del **CPD**, comparativamente con los resultados que presentaba el **ZnO** a 100ppm en cerdos destetados, sin embargo al utilizar **ZnO** a 200ppm también se ve un incremento en el consumo de pienso de cerdos destetados.

En otros trabajos como los de **Paulicks et al. (2011)**, observaron que con solo 15mg de **Zn** adicionados al pienso (trigo-cebada-soja) se mejoró significativamente el rendimiento de los cerdos, siendo similares aquellos que habían recibido 42mg de **Zn** con fuentes orgánicas e inorgánicas convencionales. También, concluyeron que la biodisponibilidad de las fuentes orgánicas utilizadas no difieren de lo encontrado cuando se suplemento el pienso con una fuente inorgánica como el **ZnSO₄** en cerdos en crecimiento.

Durante los últimos años se han realizado estudios para identificar el efecto de las fuentes orgánicas **vs** inorgánicas en piensos para cerdos en Crecimiento, encontrando divergencias que pudieran interpretarse como el resultado de las diferencias en cuanto a necesidades de nutrientes (minerales) entre cerdos destetados y cerdos en etapas de crecimiento-finalización, sexo y línea genética, las interacciones entre minerales como la cantidad de **Ca** en el pienso que puede limitar la absorción del **Zn** o la presencia de fitatos, la biodisponibilidad de las fuentes minerales utilizadas, así como a una mayor capacidad y eficiencia de los mecanismos de absorción de nutrientes en el intestino de los animales más jóvenes (**Apgar y Kornegay, 1996; Papadopoulos et al., 2009**). Cabe señalar que la mayoría de las investigaciones realizadas han sido en gran proporción en hembras y cerdos castrados y en una menor cantidad en machos no castrados por lo que, la evaluación de estos últimos es importante para poder establecer los niveles óptimos y el uso de fuentes más apropiadas para el mejor rendimiento de los animales disminuyendo posibles daños al ambiente.

Liptra et al. (1970), señalan que machos no castrados durante la fase de Crecimiento necesitan un aporte mayor de **Zn** que los machos castrados. Lo que coincide con lo señalado por **Close, 2002** quien sugiere que las necesidades de minerales por parte de los cerdos para un rápido crecimiento, considerando los genotipos existentes en la actualidad pueden ser más altas que las recomendadas en la literatura utilizada para este fin (**Hernández, 2006**). Cuando los minerales son suplementados en exceso de las necesidades del animal, es mayor la proporción de estos que se elimina debido a la disminución de la eficiencia en la utilización de ese mineral (**Spears, 1996; Burkett et al., 2009**), a menos que este exceso sea por un tiempo prolongado y exista una descompensación con otros minerales divalentes. En este contexto, muchos ensayos han demostrado que el uso de formas minerales altamente biodisponibles tienen un efecto positivo sobre el estado de salud y el rendimiento de los cerdos. A través de una mejor disponibilidad los minerales orgánicos pueden sustituir a las fuentes inorgánicas utilizando niveles inferiores, aportando beneficios para el medio ambiente sin afectar el rendimiento de los animales ya que este se mantiene o se mejora con el uso de fuentes más biodisponibles (**Fremaut, 2003**).

5.2. Consumo de Pienso en Verracos Jóvenes

La selección de los futuros reproductores esta frecuentemente relacionado con las características de **CPD** y Conversión Alimenticia (**CA**), siendo la primer característica señalada la de mayor relación con la productividad de los cerdos (**Von Felde et al.,**

1996), ya que según **Schulze et al. (2003)** la heredabilidad (h^2) de esta característica en verracos de línea materna es de $h^2=0.22$.

No obstante, es necesario señalar que en el caso de los verracos que inician una actividad de entrenamiento para la producción de eyaculados y la obtención de dosis seminales, las características de **CPD** están relacionadas directamente con la condición corporal (**CC**), dejando continuamente de lado la valoración de la ganancia de peso (**GP**) y por tanto la **CA**, ya que es común que los sistemas de atención alimenticia sean restringidos, y la de alojamiento individualizado, generando con ello una valoración animal por animal.

El suministro restringido de pienso a los verracos, está fundamentado en la eficacia de mantener a un verraco joven en “forma”, de tal manera que no produzca acumulación en exceso de grasa corporal, lo cual beneficiará en el comportamiento sexual del verraco, tanto en su entrenamiento, como en su vida sexual activa.

Marchensi (2002), señala que la valoración de los verracos debe realizarse cada semana, lo cual permitirá definir la cantidad de pienso a suministrar diariamente. Por tanto el **CPD** puede variar individuo por individuo, en las diferentes semanas de vida activa. Esta variación está en relación al **PV**, **CC** y a la calidad seminal, pero también está relacionada con las condiciones ambientales (**Lorenzo Bermejo et al., 2003**).

Por ello, en un grupo de animales pertenecientes al mismo tratamiento se pueden encontrar sementales que consuman lo mínimo recomendado (1.8Kg día^{-1}) y una cantidad no mayor a 2.5Kg día^{-1} , intentando con ello no producir un estado de desnutrición que llevase a una producción seminal limitada y de baja calidad, o un exceso en los depósitos de grasa que induzcan a un bajo rendimiento y apatía de los verracos para trabajar en el maniquí de eyaculación (**Pond, 1998; Marchesi, 2002**). Sin embargo, también es fundamental garantizar un pienso de calidad, que en cantidades como las antes señaladas contenga los niveles nutricionales necesarios para ejercer un efecto positivo en el verraco en producción.

Es por ello que en esta investigación, se realizó en los animales una valoración del **CPD** bajo un régimen de entrenamiento intensivo (diario), con un sistema de alimentación restringido. No obstante, en el control del suministro de pienso se observaron diferencias en el **CPD** entre tratamientos (**P=0.097**).

Para el caso de los verracos jóvenes se observó que existen diferencias en el **CPD** (**P=0.009**), ya que el tratamiento **Control** y el **ZnSO₄200**, mostraron diferencias estadísticas, siendo los animales del segundo los que menos **CPD** presentaron durante el entrenamiento para montar el maniquí de extracción seminal. No obstante el **ZnSO₄200**

tuvo un **CPD** promedio de 1.96Kg día^{-1} y las diferencias en **gr** fueron pequeñas (**6gr**), con respecto al resto de tratamientos, este tratamiento tuvo al igual que el **Control** variaciones individuales que iban de 1.8 a 2.5Kg día^{-1} de **CPD**, lo cual indica que las diferencias en los verracos jóvenes deben ser consideradas ya que cada animal se comporta de forma diferente (**P=0.0001**) (**Schulze et al., 2003**). Por ello, la valoración de la **CC** y si es posible del peso vivo es fundamental para definir las estrategias de suministro y por tanto de **CPD**, para que no pierdan condición física y **CC** idónea durante el entrenamiento.

Marchensi (2002), señala que los verracos deben tener una condición física que tienda a la delgadez, pero sin reducir su fortaleza por lo que la **CC**, nunca deberá ser menor de 3 (**Pond, 1998; García, 2010**).

Es importante señalar que los verracos jóvenes se comportaron de forma distinta en la tercera semana de entrenamiento, ya que el **CPD** se redujo en un 10% (**P=0.001**), es probable que esto fuera la causa de encontrar una interacción positiva en el análisis que se presenta en la **Tabla 17**.

5.3. Ganancias de Peso en Cerdos Prepúberes

La **GDP** en cerdos de entre 12 y 16 semanas de edad suelen ser calculados entre 715g día^{-1} a 965g día^{-1} (**Carr et al., 2011**). Por su parte **Campbell y Taverner (1988)** mostraron que las **GDP** eran de 670g día^{-1} a 809g día^{-1} . Estos valores indican que la **GDP** en los cerdos tratados con los distintos piensos, inclusive con el que no contenía **Zn** adicional al aportado por los ingredientes de la dieta base, se pueden considerar como adecuados.

Berg et al. (2011) señalan que el **Zn** provoca una mejora en el rendimiento de los cerdos en crecimiento, pero es fundamental encontrar los niveles adecuados para esta etapa ya que se ha observado que algunas fuentes y niveles pueden provocar efectos adversos.

Por su parte **Wedekind et al. (1994)** señalaron que al menos el 5% de los cerdos que no consumen dietas con **Zn** adicional, pueden producir signos de deficiencias (paraqueratosis), sin embargo en este estudio no se identificaron daños en piel que pudieran sugerir algún signo patognomónico de la deficiencia de **Zn**.

Por ello, vale la pena señalar que a pesar de contener **25ppm** de **Zn** en la dieta base, estos fueron suficientes para no provocar lesiones de deficiencia mineral. Es

probable que se deba a la combinación de ingredientes utilizados y al uso de enzimas exógenas (fitasas).

Las **GDP** en cerdos en el periodo de desarrollo-engorda tampoco fueron afectados por el tratamiento que no contenía **Zn** adicional.

Asimismo, las **GDP** en estos periodos fue similar a la obtenida con niveles de **Zn** entre 27ppm y 107ppm (Wedekind *et al.*, 1994), y con fuentes similares a las utilizadas en esta investigación.

En cerdos destetados se ha observado que el efecto de la fuente **ZnO** y **ZnMet** no es diferente al evaluar la **GDP**, pero al utilizar un nivel de 100ppm y 200ppm con cualquiera de las fuentes antes señaladas, existe una mejora al utilizar el mayor nivel de **Zn**. En el presente estudio las diferencias entre **ZnO** y **ZnMet** en ambos niveles fueron mayores (20%) a las observadas por Ahn *et al.* (1998) quienes obtuvieron diferencias no mayores al 14%.

van Heugten *et al.* (2003) evaluó en cerdos destetados, dos fuentes orgánicas, **ZnMet** y **Zn-Lis** a un nivel de 80ppm y 160ppm de **Zn**, y las comparó con **ZnSO₄** a los mismos niveles, no encontrando diferencias entre fuentes y niveles. En esta misma línea se encuentra el estudio de Buff *et al.* (2005) realizado en cerdos destetados utilizando 150ppm de **Zn** con dos fuentes distintas, **Zn-Polisacárido** y **ZnO**.

En 1970 Liptrap *et al.*, sugirieron incrementar a 50ppm y 80ppm de **Zn** un **PB** que contenían 22ppm y 35ppm respectivamente, ya que mejoraron la ganancia de peso en cerdos en fase de finalización. Sin embargo, estos datos fueron obtenidos con una **PB** que no utilizaba fitasas en su formulación. Estos mismos autores realizaron un estudio con machos no castrados en fase de crecimiento, observando que estos requieren de un suministro de **Zn** en el **PB** a una concentración mayor que los machos castrados. Creech *et al.* (2004), coinciden y señalan, que las fuentes de proteínatos de **Zn**, aumentan la eficiencia de crecimiento de los cerdos comparada con **ZnSO₄**, y recomienda que el 50% del requerimiento de **Zn** sea a través de una fuente orgánica.

Sin embargo, en esta investigación el tratamiento **Control** tuvo un comportamiento superior al resto de tratamientos en los periodos de desarrollo y engorda. Una razón puede ser el incremento en el **CPD** y la mayor biodisponibilidad del **Zn** contenido en el **PB**, debido a la inclusión de fitasas.

No obstante que las **GDP** en los tratamientos aplicados en los periodos de crianza (crecimiento-engorda) no mostraron reducción de las metas de peso propuestas para estos periodos, sería conveniente realizar mayor cantidad de estudios en cerdos no castrados.

Asimismo, habría que evaluar que los niveles de **Zn** (25ppm) en el tratamiento **Control**, solo se pueden sugerir si la combinación de ingredientes en el pienso base ayuda a obtener los resultados de este estudio. **Wedekind et al. (1994)** señala que dietas con maíz-soja no son adecuadas para los cerdos, cuando no se les suministra una fuente de **Zn** y se elevan los niveles por encima de 37ppm para las etapas de desarrollo-engorda.

5.4. Ganancia de Peso en Verracos Jóvenes

En el caso de los verracos jóvenes, los resultados mostraron que el suministro controlado de pienso, fue adecuado. Los pesos finales de los verracos jóvenes fue similar, ya que no se mostraron diferencias estadísticas (**P=0.092**). **Louis et al. (1994)** y **Wilson et al. (2004)**, han señalado que mantener en un peso controlado a los verracos evita la aparición de problemas de aplomos, bajo libido y reducción en la calidad seminal.

Los pesos semanales obtenidos mostraron la uniformidad en la ganancia de peso semanal durante las 16 semanas de investigación. Este comportamiento es recomendado por **Kemp (1989)** y **Wilson et al. (2004)**.

Los valores medios de **GPS** oscilaron entre 1.260Kg semana⁻¹ a 1.690Kg semana⁻¹ (**ZnSO₄150** y **ZnO200** respectivamente) siendo superiores a los publicados por **Louis et al. (1994b)** quienes suministraron 1.8Kg a 2.0Kg de pienso día⁻¹ verraco⁻¹ obteniendo una ganancia de 1.180Kg semana⁻¹ verraco⁻¹. **Kemp et al., (1989)** recomiendan para verracos jóvenes (<12 meses) una ganancia de peso diaria de 400 g día⁻¹ (2.800Kg de ganancia semana⁻¹). Una vez alcanzado el año de edad, aconsejan una ganancia diaria de 200g (1.400Kg semana⁻¹). Esta última recomendación sólo fue alcanzada por los tratamientos **ZnSO₄200** (1.670Kg), y **ZnO200** (1.720Kg) aunque no reflejaron diferencias con el resto de tratamientos.

Teniendo en cuenta a la **GPS** se realizaron los cambios de suministro (Kg) de pienso de forma individual. Aquellos animales que mostraban **GPS** positivas pero por debajo de 160g día⁻¹, les fue adicionado entre 100g a 200g más de piensos día⁻¹, hasta conseguir que el verraco mejorara, lo cual, fue más fácil conforme transcurrieron las semanas de estudio debido a que al aumentar la edad, los requerimientos nutricionales

de los verracos disminuyen y la **GPS** son más fáciles de mantener con el sistema de alimentación establecido (**Kemp et al., 1989; Colembrander y Kemp, 1990; Mateos et al., 1997**).

5.5. Conversión Alimenticia en Cerdos Prepúberes

La **CA** se reconoce como un indicador fundamental para identificar el potencial productivo de los cerdos y la calidad del pienso suministrado (**Losinger, 1998**). Por su parte **Nechtelberger et al. (2001)** señalan que existen diferencias en la **CA** al comparar razas (Large White 2.76; Landrace 2.82; Pietrain 2.59).

En este caso se puede señalar que el efecto del **Zn** contenido en el pienso genero las diferencias en la **CA**, en el periodo Desarrollo y Finalización.

Los valores de **CA** obtenidos en los periodos antes señalados, fueron similares a las publicadas por **Wedeking et al. (1994)**. Estos autores utilizaron las tres fuentes empleadas en esta investigación y se observó que la **CA** fue similar en ellas. Los valores de **CA** fueron para la fuente **ZnSO₄** de **3.76**, en tanto para **ZnMet** y **ZnO** fue de **3.64**.

Los datos antes señalados son mayores a los encontrados en esta investigación, ya que la fuente oxidada mostro valores de **2.88** a **3.42** en **CA**. También los de la fuente de **ZnMet** mostraron ser inferiores como se puede observar en la **Tabla 20**.

Lo que es importante destacar es que ninguna de las fuentes mejoró los valores de **CA** producidos por el tratamiento **Control**. Esto seguramente fue debido a la **GDP** obtenida en este periodo de desarrollo.

En el caso del periodo de Finalización, los resultados mostraron una **CA** distinta, debida al efecto de los tratamientos, pero los valores fueron menores a los reportados por autores como **Wedeking et al. (1994)**, pero mayores a los reportados por **Varley (2011)** y el **INRA (2009)**. La **CA** que se recomienda en cerdos en finalización (entre 70 y 100kg de **PV**) es no mayor a 3.25, por lo que solo el tratamiento que utilizo **ZnSO₄150** fue el que mostró **CA** por debajo de los valores recomendados.

Es probable que las **CA** encontradas en esta investigación, se deban más al efecto del **Zn** sobre el consumo voluntario, que las **GDP** observadas, ya que está bien documentado el hecho de que el mineral favorece el apetito de los cerdos (**Hill et al., 2000; Molist y Davin, 2013**).

5.6. Índice Gonadosomático

El **PT** bilateral (**PTD**, **PTI**) y **PTM** de los cerdos alimentados con dietas que fueron adicionadas con la fuente **ZnSO₄**, mostraron que el nivel de 200ppm de **Zn** afecta el crecimiento de los testículos en los cerdos prepúberes, ya que estos animales produjeron un peso significativamente menor (**P=0.006**). Esta reducción fue alrededor de 150g, y por ello ningún **PT** en el **ZnSO₄200** superó los 237g. Este efecto no fue observado en el resto de los tratamientos, ya que si bien no hubo diferencias (**P>0.05**) entre los que usaron **ZnO** o **ZnMet** y el mismo tratamiento **Control**, sí se observó que en todos los casos el uso de 200ppm no desmejoraron el **PT**. Sin embargo, al comparar los **PT** obtenidos en esta investigación, se observó que están por debajo de los obtenidos por **Allrich et al. (1983)** y **At-Taras et al. (2006)**, siendo estas diferencias tan grandes, que prácticamente se observa un 50% menos del **PT**. Por su parte **Ren et al. (2009)**, mostraron que los **PT** de los cerdos de 10 meses tuvieron un peso medio de 230.2±74.8g, estos valores son menores a los obtenidos en esta investigación, al menos comparativamente con los tratamientos que utilizaron **ZnO** y **ZnMet**, pero similares a los obtenidos en los cerdos afectados por el nivel de 200ppm de **Zn** (234±0.024g) con la fuente **ZnSO₄**.

Por su parte los verracos tratados con las diferentes fuentes y niveles de **Zn**, y con una edad de 18 meses, mostraron valores de **PTM** entre 302g y 335g (**EEM=0.038**), no encontrando diferencias (**P>0.05**) entre los siete tratamientos. Con base a estos resultados se puede señalar que no existió una mejora en el **PTM**, ni tampoco de forma particular en el lado derecho o izquierdo de los cerdos, al finalizar la fase experimental. En los verracos por lo tanto, no se mostraron **PT** diferentes a los que encontró **Šprem et al. (2011)**, quienes obtuvieron de cerdos criollos de entre uno y dos años de edad, pesos testiculares de 324.21g (**EEM=148.03**). Si consideramos que los cerdos utilizados para esta investigación, fueron **F1** se puede señalar que están dentro de los límites inferiores normales.

En cuanto al **PV** se observó que los cerdos jóvenes y los verracos no mostraron diferencias (**P>0.05**) entre los tratamientos, siendo los valores acordes a la línea genética correspondiente a estos animales. Pero sí se observó que el **PV** generado por los tratamientos, fue similar al comportamiento que se describe en otros estudios (**Green et al., 2003**). En el caso de los estudios realizados por **Hernández et al. (2009)**, en donde utilizó **Zn** a niveles de 40ppm y 80ppm, incluyendo una fuente proteínada de **Zn**, mostró resultados similares a los de la presente investigación (**Tabla 19**).

El **IG** realizado en los cerdos jóvenes mostró valores entre 0.24 y 0.39. Los valores más pequeños fueron obtenidos en los cerdos que consumieron el tratamiento con **ZnSO₄200**, induciendo estos a establecer una diferencia (**P=0.002**) con el tratamiento que utilizó la misma fuente de **Zn**, pero a un nivel de 150ppm. En tanto que no hubo diferencias (**P>0.05**) entre los niveles de **ZnO** y **ZnMet**. Tampoco se vio afecto el **IG** por utilizar el tratamiento **Control**, inclusive los valores fueron los segundos mejores obtenidos en esta investigación, obteniendo resultados de **IG** entre 0.32 a 0.34 (**Tabla 21**).

Por su parte, los verracos, mostraron que los **IG's** no fueron valores mayores a 0.183, y aunque no eran diferentes entre los tratamientos utilizados en esta investigación (**P>0.05**), si es de resaltar que los valores fueron al menos 50% más pequeños que los que se obtuvieron en los cerdos en la etapa de crianza. En estudios realizados por **Costa et al. (2010)**, se observa que los valores de **IG** que se muestran en cerdos en crecimiento están dentro de los valores de 0.4.

El volumen testicular, diámetro y longitud tomada por ecografía, se correlaciona (**P=0.001**) con el peso testicular cuando estos fueron tomados en cerdos de entre 4 y 7 meses. En verracos mayores a esta edad, la evaluación no pudo realizarse debido a que los límites del instrumento ecográfico no lo permitieron.

Las correlaciones entre peso testicular y el diámetro testicular va disminuyendo con forme la edad avanza en los machos. Los túbulos seminíferos se expanden y eso permite observar un incremento en el tamaño testicular.

Existe una relación estrecha entre el crecimiento de los testículos pos puberal, cuando el aumento del número de **CS** se obtiene. La proliferación de las **CS** cesa cuando la formación de la barrera de sangre-testículo, se establece; y entonces se produce un desarrollo luminal de los túbulos seminíferos y se incrementa también la secreción de fluidos luminales. La evaluación de la circunferencia escrotal en cerdos es difícil de realizar, y es imprecisa, ya que debido a su situación anatómica es imposible obtener una medida de la circunferencia escrotal que se relacione adecuadamente con el desarrollo de los túbulos seminíferos.

5.7. Análisis de la Concentración de Células de Leydig, Células de Sertoli, Peso Testicular, Peso Vivo y Concentración de Testosterona en Cerdos Prepúberes y Verracos Jóvenes.

El **Zn** es un mineral que ha sido descrito como fundamental en los procesos reproductivos y de regeneración celular, debido a ello se puede afirmar que el **Zn** afecta directamente el desarrollo de las **CL** (**Piotrowska et al., 2011; Khalaf et al., 2014**), es por ello que en esta investigación se resalta el hecho de que al incluir un tratamiento con **25ppm de Zn (Control)** produjo un efecto sobre el número de **CL** en los testículos de cerdos prepúberes, debido a una reducción significativa de 28.5% en cerdos prepúberes y en verracos jóvenes de un 14.61%. **Khalaf et al. (2014)** señalan que el número de **CL** se afecta cuando existe una deficiencia de **Zn**. Por su parte **Lunstra et al. (2003)** evaluaron el número de **CL** en machos porcinos, encontrando valores para esta especie de 24.04 a 57.48 **CL g⁻¹** testicular en cerdos de 112 y 220 días de vida.

Debido a que para este estudio solo fueron contadas las **CL** ubicadas en el compartimento intertubular, los resultados mostraron ser semejantes a los reportados por **Costa et al. (2013)**, quienes encontraron 12.9 ± 1.5 **CL**, mientras que para este estudio se observaron valores entre las 14 a 20 **CL** en cerdos prepúberes. Para el caso de los verracos jóvenes en número de **CL** encontrado fue de entre 15.6 a 19.6, lo cual indica que el efecto de los tratamientos fue similar al incluir **Zn** en el pienso, siendo dichos valores superiores a los reportados por **Costa et al. (2013)**.

Al comparar los valores del tratamiento **Control** con las fuentes inorgánicas probadas y las orgánicas se pudo identificar que existió una reducción de al menos un 25% de **CL** con respecto a las fuentes inorgánicas y en un 31% con respecto a los tratamientos con las fuentes orgánicas en los cerdos prepúberes. En el caso de los verracos jóvenes se observó que la reducción en el número de **CL** con fuentes inorgánicas de **Zn** fue de 17.9% con **ZnSO₄** y del 22.75% con **ZnO**, mientras que las mayores diferencias fueron con la fuente orgánica, ya que el **ZnMet** mostró un incremento en el número de **CL** comparado con el Control del 23.07%. **Mozaffari et al. (2015)**, señalan que el uso de **ZnO** genera efectos dañinos sobre los tejidos testiculares, lo cual podría estar relacionado al menor número de **CL** encontradas.

Franca et al. (2005) y **Campo (2009)** han señalado que la importancia de las **CL**, desde el punto de vista reproductivo es la síntesis de andrógenos, la producción de factores de crecimiento, factores ligados a relaxina, y otras sustancias fundamentales en el desarrollo testicular. Sin embargo, estos autores establecen que el número de **CL** no

es lo fundamental, sino el tamaño de la misma célula la cual a su vez está relacionada con la cantidad de retículo endoplásmico liso contenido. Por lo que, el retículo endoplásmico liso, es el orgánulo citoplásmico más notable de las **CL**, por ser el lugar de acción de una serie de enzimas que intervienen en la síntesis de testosterona, donde el **Zn** favorece dicha síntesis (**Christensen, 1965; Hesketh, 1982**). En un estudio realizado por **Franca et al. (2005)** se encontró que el número de **CL** por **gr** de testículo ocupa el 10% del tejido gonadal.

Por lo tanto el número de **CL** obtenidos en este estudio pudo estar relacionado con la producción hormonal. Esto a su vez, puede ser un factor para que el comportamiento de los cerdos en su vida futura como reproductores se vea afectada, ya que **Arthington et al. (2002)**, **Favier y Hininger-Favier (2005)** y **De Loera et al. (2011)** señalan que las **CL** están relacionadas con el comportamiento libidico de los cerdos, debido a su relación con la producción de la hormona testosterona.

Revy et al. (2003) mencionan que las dietas de cerdos deberían contener **Zn**, por ello en la actualidad el **NRC (1988)**, el **NSNG (2010)**, **FEDNA (2013)** entre otras fuentes, recomiendan la adición de este mineral en el pienso durante todo el ciclo de vida de los cerdos. Las concentraciones de **Zn** recomendadas son diversas y dependen de la edad de los animales, dichas concentraciones las podemos encontrar que van desde 50ppm a 200ppm de **Zn**. Sin embargo autores como **Quiles (2009)** y **García (2010)** han señalado que es probable que las cantidades de **Zn** recomendadas para cada etapa de producción de los cerdos deberían ser menores (**Creech et al., 2004**). Esto último debido al efecto sobre el equilibrio mineral, la absorción del propio **Zn**, y al efecto negativo que los excesos de este mineral ocasionan en el ambiente (**Revy et al., 2003**). Aunque no hay que olvidar que lo anterior está relacionado con la biodisponibilidad de las fuentes a utilizar (**Quiles, 2009; Revy et al., 2003; García, 2010**).

Son pocos los trabajos que señalan que una baja concentración de **Zn** en suero puede causar una disminución de la síntesis de testosterona por las **CL**, lo cual podría conllevar a la disminución de la transformación de testosterona a **DHT** a causa de la disminución de la actividad de la 5 α -reductasa y de Metaloenzimas dependientes **Zn** (**Piotrowska et al., 2011**).

Por otra parte es prácticamente inexistente la información que indique el daño celular que genera el exceso de **Zn** (**De Loera et al., 2011**), sin embargo **García et al. (2011)** demostraron un efecto negativo sobre las células espermáticas cuando se utilizaron niveles de 200ppm con una fuente orgánica de **Zn**.

Es importante señalar que estudios recientes sobre el efecto del **Zn** en el desarrollo de las **CL** en cerdos prepúberes no existen, por lo que se debe asumir, que las recomendaciones mínimas de por lo menos utilizar 25ppm de **Zn**, en el pienso de los machos prepúberes y verracos en activo. Lo antes señalado se ve reforzado al analizar la información de **Hill et al. (1986)** y **Wedekind et al. (1994)**, quienes señalan que por lo menos la concentración de Zn en los piensos de cerdos debe estar entre 24 a 33mg de **Zn Kg⁻¹** de **MS**. **Quiles (2005)** señala que con 40mg de **Zn Kg⁻¹** de **MS**, en machos puede ser suficiente, aunque al iniciar su vida reproductiva activa y más de un salto por semana, las necesidades de este mineral aumentan. Por su parte **Creeck et al. (2004)** señalan que con 50ppm de **Zn** el pienso es suficiente para mantener un crecimiento adecuado en los cerdos en crecimiento.

Por otra parte **Wedekind et al., (1994)** y **Schell y Kornegay (1996)** mencionan que utilizar **Zn**, en forma de las llamadas fuentes orgánicas, se puede producir un crecimiento adecuado y estable en los cerdos, ya que su biodisponibilidad (>70%) es mayor (**Poulsen y Carlson, 2001; Carlson y Poulsen, 2003**). Sin embargo, vale la pena señalar que dichos estudios no refieren dato alguno sobre el efecto de las fuentes orgánicas en el desarrollo de los órganos reproductivos del macho en cualquiera de las etapas de su vida.

Es interesante observar como los tratamientos que utilizaron fuentes orgánicas, se comportaron de la misma manera que las fuentes inorgánicas, por lo que no se vio mejora en el número de **CL**, al utilizar el **Zn Met**, lo cual coincide con los resultados que obtuvieron en aspectos de crecimiento **Hill et al. (1986)**, **Zwinckels et al. (1996)**, y **García (2010)**.

En el caso del **PT**, **Fuentes et al. (1995)** señalan que un macho futuro reproductor debe tener testículos grandes, por lo que dentro del proceso de selección se analiza el tamaño de estos órganos (**Bernardi et al., 2010; López et al., 2013**). La recomendación en la selección de los machos es elegir a los de mayor tamaño testicular, ya que en la medida que los testículos son más grandes, la producción de células espermáticas se aumenta (**Fuentes et al., 1995; Huang y Johnson, 1996; Lunstra et al., 2003; Bernardi et al., 2010; Brunet et al., 2014**). Asimismo, **García (2010)** señala que ambos testículos deben ser lo más similares posible en tamaño, posición y peso. En este sentido los cerdos prepúberes y verracos jóvenes que recibieron los tratamientos, no mostraron asimetrías en posición y tamaño. Sin embargo, al analizar el **PT**, se observó que existía

un mayor peso en los testículos del lado izquierdo en los animales de ambas etapas, lo cual coincide con los resultados obtenidos por **Mendez et al. (2005)**.

Asimismo, al evaluar el efecto del tratamiento sobre el **PT** en ambos testículos, se observó que en el derecho (**PTD**), las diferencias no fueron estadísticamente suficientes para evidenciar que los tratamientos habían producido un efecto distinto. Sin embargo, en el caso de los testículos izquierdos de los cerdos jóvenes, si existió evidencia que indica que los testículos de los cerdos tratados con **ZnSO₄200** fueron más pequeños que el resto de los testículos de los seis tratamientos restantes. **Chanmugam et al. (1984)**, **Khalaf et al. (2014)** encontraron que ratas que fueron tratadas con una dieta ausente de **Zn**, produjeron una reducción del tamaño testicular de más del 50% del tamaño normal cuando recibieron un pienso con los niveles de **Zn** recomendados para su mantenimiento. No obstante, en esta investigación, es de resaltar que solo existieron diferencias entre los tratamiento **ZnSO₄150** y **ZnSO₄200**, ya que el primero fue quien mostró tener un **PT** superior a la media de todos los tratamientos (**PTM**= 346.93±15.31g) y el segundo tuvo el menor **PTM** (233.75±4.65g).

Vale la pena señalar, que no solo el **Zn** puede producir un efecto sobre estas variables analizadas, dentro de las propias fuentes minerales utilizadas en la alimentación animal existe la presencia de otros elementos como es el caso del Azufre, que pudieran estar generando un efecto adicional. Por tal motivo, es probable que la cantidad de azufre haya producido un efecto negativo, al sumarse con otras fuentes minerales que lo contenían. **Meng y Bai (2004)**, **Zhang et al. (2006)**, señalaron que el azufre puede llegar a producir daño en distintos órganos (riñón, hígado, corazón) incluido los testículos, cuando se exponen a los animales a concentraciones altas de dióxido de azufre (contaminante ambiental), ya que genera una reducción de las enzimas que intervienen en procesos protectores (antioxidantes) como la Superóxido Dismutasa, Glutación Peroxidasa, entre otras. Si bien el dióxido de azufre es un contaminante ambiental, y las rutas metabólicas que sigue el azufre no indica la producción de dicho contaminante, es probable que exista un efecto de este mineral aún no reportado.

En este sentido, al observar los valores de los **PT** de otros tratamientos, se alude al hecho de que los tratamientos con 200ppm que fueron suministrados con la fuente **ZnO** y **ZnMet**, no produjeron efectos adversos sobre los **PT** y por el contrario el peso (**gr**) fue mayor que en los del nivel de 150ppm. Es por ello que genera un mayor interés el efecto dañino que se presentó con el uso de la fuente azufrada en el **PT** cuando recibieron el tratamiento con 200ppm.

En cuanto a los intervalos de valor del **PT** encontrados en los siete tratamientos, se puede señalar que los pesos (**g**) en general son superiores a los reportados por autores como **Mendez et al. (2006)**, quienes señalan que cerdos con una edad media de cinco meses tenían testículos con pesos entre los 177.7**gr** a 199.7**gr**, mostrando además que los testículos del lado izquierdo siempre fueron significativamente más grandes que los derechos. Asimismo, se pudo observar que el **PT** en este experimento fue mayor en aproximadamente el doble de lo reportado por los autores antes señalados, así como los encontrados por **Kluber et al. (1986)** (346.99**g**) y **Lunstra et al. (2013)** (309**g**). A pesar de las similitudes que mostraron los resultados de esta investigación en el peso testicular de los cerdos prepúberes, los autores antes señalados trabajaron con cerdos de al menos 60 días más de edad que los pertenecientes a esta investigación. Por ello, es importante señalar que los **PT** obtenidos, tuvieron un desarrollo mayor a los que encontrados en los estudios de **Klumber et al. (1986)**, y **Mendez et al. (2006)**. En el caso de los verracos jóvenes se observó que el peso de los testículos no mostro diferencias, ya que los **PT** no tuvieron diferencias mayores a 33.7**g**. **Straaten y Wensing (1977)** señalaron que a las 25 semanas de edad los verracos tenían pesos testiculares de 125**g**, sin embargo el desarrollo genético de los cerdos ha incrementado el valor de las gónadas y su peso ha sido motivo de selección, ya que este representa la posibilidad de mayor concentración celular espermática y una mayor libido. Por ello, hoy es frecuente encontrar pesos testiculares superiores a los 280**g** o más como es el caso de los resultados de este estudio.

En el caso del **PV**, se puede señalar que las diferencia significativas mostradas en la etapa de cerdos prepúberes evidenciaron que el **PV** no mejoró con el uso de fuentes inorgánicas de **Zn**, pero si al utilizar 200**ppm** con la fuente **ZnMet** (Tabla 23; Contraste **C₅**).

En una investigación desarrollada por **Wedekind et al. (1994)** no se encontró mejora del **PV** de cerdos en crecimiento, cuando se incluyeron dietas que contenían 27**ppm** o 32**ppm** de **Zn**. En este caso los niveles incluidos de **Zn** en el pienso tampoco generaron **PV** diferentes, excepto con la fuente oxidada (**C₃**). Los 50**ppm** de **Zn** aumentados en el tratamiento **ZnO200ppm** generaron 14,65**Kg** más de **PV**.

Por su pare el **PV** de los cerdos prepuberales que consumieron **ZnO150** y el **ZnMet200** mostraron una diferencia de peso de 19**Kg**, la cual fue significativa.

En esta investigación los resultados generados en el análisis de comparaciones ortogonales indicaron un efecto de la fuente orgánica, la cual mejoró significativamente el **PV** de los cerdos al finalizar la fase prepuberal (entre 3.5Kg a 13.5Kg más de **PV** para **ZnMet1500** y **ZnMet200** respectivamente **vs** Fuentes Inorgánicas). Sin embargo, en verracos jóvenes no se encontró ninguna diferencia en **PV**.

A pesar de no encontrar diferencias significativas, las tendencias observadas al utilizar los análisis de comparaciones ortogonales, describen que 50ppm más de **Zn** en el pienso de verracos jóvenes, mejora el **PV** cuando se utilizan fuentes inorgánicas.

En el caso de las fuentes metionatadas, se observa que el peso de los verracos jóvenes tiende a ser menor que en los tratamientos inorgánicos, es probable que esto se deba a que los verracos que consumieron **ZnMet** tuvieron un ritmo de trabajo constante, lo que hizo que cada semana produjeran una monta. Sin embargo, esto no sucedió con los verracos de las fuentes inorgánicas, lo cual evidentemente tiene que ver con el **PV**, ya que tuvieron menos días de descanso los verracos que consumieron **ZnMet**.

Es importante señalar que existe controversia sobre el beneficio de utilizar fuentes orgánicas en el pienso (**Spears, 1996; Quiles, 2006**). **Hernández et al. (2008)** demostraron que existía una ganancia de peso similar en cerdos que utilizaron tanto fuentes orgánicas (proteinato de **Zn**) como **ZnSO₄**, aun y cuando las diferencias entre los tratamientos fuesen de 105ppm de **Zn** (65ppm **vs** 170ppm de **Zn** respectivamente) como fuente inorgánica.

El **ZnO** ha sido descrito de forma muy amplia como un elemento terapéutico y como promotor del crecimiento, donde se utilizan en concentraciones de 2000ppm a 3000ppm, evidenciando un desarrollo del crecimiento positivo (**Buff et al., 2005, Jacela et al., 2010; Jang et al., 2014**). Sin embargo, en un estudio realizado por **Hanne et al. (1995)** mostraron que aunque se ingrese mayor cantidad de **Zn** en el pienso de cerdos en crecimiento, a razón de 120ppm el crecimiento no mejora, ya que existe un fuerte proceso homeostático en el intestino que impide que se transfiera el mineral. En este estudio el uso de más de 120ppm (200ppm) de **Zn** si mejoraron el **PV**. Existe evidencia que señala que al utilizar una forma química conjugada no covalente de **Zn (ZnO)**, se puede reducirse su uso y producir un efecto similar al nivel terapéutico (**Jang et al., 2014**), lo cual tiene efecto en la regulación de la secreción de los péptidos cerebro-intestinales que estimulan el consumo voluntario (**Li et al., 2010**).

Los resultados obtenidos con respecto a la **[T]** mostraron que el **ZnMet200** fue el tratamiento que mayor producción de esta hormona género en los cerdos prepúberes y verracos jóvenes. **Gupta et al. (1988)** y **Dissanayake et al. (2009)**, describieron la necesidad de ingresar **Zn** al pienso de los machos para evitar la degeneración y atrofia testicular. Asimismo, el deterioro en la espermatogénesis y baja calidad espermática se han relacionado con deficiencias de **Zn**. Una forma indirecta de evaluar el efecto del nivel y fuente de **Zn** en el pienso es la determinación de **[T]**, la cual indica el estado que guardan las gónadas y por tanto de las **CL**. Se ha reportado que el uso de **ZnO** puede afectar a las **CL** e inhibir la síntesis de testosterona, esto debido a una reducción significativa en el número de **CL** (**Talebi et al., 2013**).

La **[T]** en los cerdos prepúberes por su parte, se mostró en un intervalo de **2.52ng mL⁻¹** a **4.05ng mL⁻¹**, mientras que en verracos jóvenes los intervalos de valor fueron de **1.92ng mL⁻¹** a **3.89ng mL⁻¹**. Estos valores son menores a los reportados por **Deka et al. 2015**), quienes utilizaron **100ppm**, **200ppm** y **300ppm** de **Zn** (**4.77ng mL⁻¹**, **6.54ng mL⁻¹** y **9.75ng mL⁻¹** de **T** respectivamente) en el pienso de cerdos de cinco meses de edad, es importante señalar que los autores no identifican la fuente mineral utilizada en el pienso. Por su parte **Allrich et al. (1982)** señalaron que la **[T]** depende de la edad y por ello los valores pueden ir de **1.31ng mL⁻¹** a **15.76ng mL⁻¹** en edades comprendidas entre los 40 a 250 días. Estos valores pudieron ser al menos a los 40 días de edad, más semejantes a los del presente estudio.

El número de **CL** encontrada en el intersticio tubular, fue similar en todos los tratamientos en ambas etapas de los cerdos, excepto en el tratamiento **Control**. Pero a pesar de estas diferencias numéricas, el grado de correlación (**r**) entre **[T]** y **CL** no fue significativo en los cerdos prepúberes.

Por su parte la correlación entre **CL** y **[T]** en verracos jóvenes demostró que si existe una relación de al menos un 30% entre el número de **CL** y los **ng mL⁻¹** de testosterona producida. Lo cual coincide con **Om y Chung (1996)**, **Croxford et al., (2011)**, **Penchev (2011)** quienes señalan que las **CL** están relacionadas en la producción de **[T]**.

Otras investigaciones han resaltado la importancia de la edad de los cerdos, la cual al aumentar inducen a un incremento en el volumen de las **CL** y con ello un incremento en la **[T]**. El volumen de las **CL** con la edad representa un tercio del volumen testicular, por ello **Franca et al. (2000)** señalan que el grado de desarrollo de las **CL**, también es importante considerarlo, ya que no es solo el número de **CL**, sino la

funcionalidad de las misma, reflejada en el desarrollo de esta célula. Es por ello que al analizar las imágenes de los cortes histológicos de las **CL**, se observó un tamaño mayor en aquellos tratamientos que incluyeron como fuente de **Zn**, la orgánica (**ZnMet**).

También se puede resaltar el hecho de que el uso de la fuente orgánica produce un efecto positivo en la **[T]**, y las diferencias entre fuentes pueden ayudar a definir el uso de las fuentes orgánicas para producir una mayor cantidad de testosterona. No existe evidencia científica que coincida con este estudio en el sentido del nivel utilizado de **Zn**, por lo que es importante resaltar que el uso de 150ppm, da los mismos resultados que utilizar 200ppm.

Los niveles de **Zn** antes señalados, deben ser utilizados para recomendar, que si bien no existe diferencia en la **[T]**, será mejor un nivel menor, llevando con ello a una reducción en la excreción de este mineral, e impactando menos al ambiente.

El **DTS** en cerdos cambia según la edad (**Franca et al., 2000**). El **DTS** encontrado en los testículos de los cerdos prepúberes y en los verracos jóvenes no mostró ser distinto a pesar de no haber adicionado fuente de **Zn** en el tratamiento **Control**.

También se observó que no hubo efecto distinto por la fuente de **Zn** utilizada en el pienso (orgánica **vs** inorgánicas) en ambas etapas productivas.

Sin embargo, se observa una tendencia a deteriorar el **DTS**, cuando se utilizaron 200ppm de **Zn** con la fuente **oxidada** en los cerdos prepúberes, la cual no continuó en los verracos jóvenes. **Costa y Straggiotti (2006)** describieron **DTS** mayores a los encontrados en este estudio ($249 \pm 33.0 \mu\text{m}$). En otro estudio realizado por **Costa et al. (2013)** en cerdos ferales, observaron valores de **DT** de $243 \pm 8.0 \mu\text{m}$. En cualquiera de los casos los valores son prácticamente el doble de lo encontrado en este estudio, sin importar la fuente y el nivel de **Zn**. Por su parte, **Lunstra et al. (2003)** obtuvo **DTS** en cerdos de distintas edades (1 día de nacido a 220 días de vida) valores de $51 \mu\text{m}$ a $265 \mu\text{m}$. **Haeussler et al. (2007)** también hicieron valoraciones en lechones recién nacidos y obtuvieron valores de **DTS** de $57.28 \mu\text{m}$. Lo cual marca la pauta para señalar que los **DTS** de este estudio estuvieron por debajo de los valores reportados por los autores antes señalados.

El papel del **Zn** en la protección de las células germinales testiculares ha sido estudiado por **Maremanda et al. (2014)**. Con base en lo anterior, en esta investigación se podría haber esperado que el tratamiento **Control** en ambas etapas productivas de los cerdos estudiadas, se pudiera haber encontrado un número menor de **CS**.

Las **CS** son estimuladas por la **FSH** hormona para la cual el **Zn** participa en su síntesis y excreción. Esta **FSH** promueve la producción de glicoproteínas y proteína de unión a andrógenos, que genera una elevada **[T]** alrededor de las células germinales para la adecuada producción de la espermatogénesis. Por otra parte el **Zn** también participa en la producción de otras hormonas sexuales y factores de crecimiento como es el caso de la testosterona y **GnRH** (Kheirandish *et al.*, 2014).

Los valores numéricos de **CS** encontrados demostraron que al menos un 50% en los cerdos prepúberes y un 60% en verracos jóvenes disminuyó la cantidad de estas células. Sin embargo esta reducción mostró ser diferente entre fuentes de **Zn**, y en particular la fuente orgánica produjo este efecto.

Haeussler *et al.* (2007), mostraron que el número de **CS** por túbulo seminífero era de 10.35 en lechones recién nacidos. En este caso el número de **CS** fue de 1.35 a 4.72 **CS** por túbulo en cerdos prepúberes y de 1.68 a 4.12 en verracos jóvenes. Valores que están muy por debajo de los valores encontrados en los túbulos seminíferos estudiados por Haeussler *et al.* (2007).

Sharpe *et al.* (2003), Ou *et al.* (2014) demostraron que el número de **CS** en el testículos de animales adultos está relacionado con el peso testicular, lo cual no ocurrió en este estudio. Estudios en ratones han demostrado que deficiencias de **Zn** conllevan a la atrofia de los túbulos seminíferos y con ello la interrupción de la espermatogénesis (Ozturk *et al.*, 2003).

En general se puede señalar que el **Zn** en los testículos de cerdos prepúberes y verracos jóvenes activos, no mostró una mejora substancial en las variables estudiadas, y sin embargo, si se observa que existe un comportamiento diferente entre fuentes de **Zn**, logrando establecer que es probable que los cerdos prepúberes no necesiten niveles ni siquiera cercanos a los 150ppm de **Zn**. Asimismo, se puede señalar que el utilizar fuente orgánica tampoco demuestra mejoras substanciales en las variables testiculares, por lo que en tanto no se realicen mayores estudios, es mejor seguir utilizando valores por debajo de 150ppm de **Zn**.

5.8. Concentración de minerales en tejidos de cerdos prepúberes y verracos jóvenes.

5.8.1. Concentración mineral en bazos obtenidos de cerdos prepúberes.

El bazo en particular mostró valores de 83.68ppm a 103.47ppm de **Zn** (Tabla 31). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por **van Heugten et al. (2003)** quienes utilizaron **ZnSO₄** y **ZnMet**, pero prácticamente el doble encontrado por **Burch et al. (1975)**. Estos autores además indican que al utilizar una dieta con carencia de **Zn**, no se reduce el contenido de **Zn** en el bazo, lo cual coincide con este estudio, ya que la concentración de **Zn** en el bazo de los cerdos que fueron tratados con el tratamiento **Control**, mostraron valores significativamente iguales al resto de los tratamientos que contenían 150ppm y 200ppm de **Zn**. En el 2013, **Davin et al.**, realizaron un estudio con lechones y observaron que la concentración de **Zn** era igual (22.1ppm) para aquellos cerdos que fueron tratados con bajos niveles de **Zn**, como para los que utilizaron dosis terapéuticas.

Si bien la concentración de **Zn** en el bazo encontrado en este estudio no semeja a los valores reportados por otros autores, es importante resaltar que la concentración de **Zn** es alta, ya que este órgano está considerado como un buen almacén del mineral (**Rojas et al., 1995; Krebs, 2000**). En un estudio realizado por **Wang et al. (2010)** se observaron valores en el bazo de lechones de 165ppm a 174ppm de **Zn**, con dietas que utilizaron como fuente **Zn** quelatado con aminoácido, estos valores son mayores a los encontrados en este estudio, a pesar de que la cantidad suministrada a través del pienso no supero los 100ppm de **Zn**. En este mismo estudio, se señala que el utilizar 3000ppm de **Zn** con **ZnO** no aumento significativamente la concentración del mineral en el tejido. Como tampoco se observó un efecto negativo con respecto al nivel del **Zn** en el pienso y la concentración de otros minerales como el **Fe**, **Zn** y **Mn**. En el bazo la relación que guarda el **Zn** con **Cu**, **Mn**, **Fe** y **Mg** en este estudio, ha sido identificada también por otros autores, quienes indican que el **Zn** se incrementa en proporción con el aumento del resto de minerales antes señalados.

5.8.2. Concentración mineral en páncreas obtenidos de cerdos prepúberes

Los resultados mostraron que el tratamiento **Control** ejerció un efecto detrimental en el contenido de **Zn** pancreático. Las concentraciones de **Zn** en los tratamientos que contenían alguna de las fuentes de **Zn**, mostró mayores concentraciones de **Zn** en el parénquima pancreático (entre 110.59ppm a 216.76ppm). Se observó que al incrementar 50ppm de **Zn** con cualquiera de las fuentes empleadas (inorgánicas y orgánicas), la concentración de **Zn** en el páncreas se reducía, este efecto fue significativamente evidente en la fuente **ZnSO₄**, ya que el tratamiento **ZnSO₄200** redujo 106ppm de **Zn** en el páncreas. **Brzovic et al. (1994)** y **Davin et al. (2013)** reportaron valores de **Zn** en el páncreas de 36.1ppm a 46.1ppm, estos valores son evidentemente menores a los obtenidos en este estudio. Pero a diferencia de **Wang et al. (2010)**, si observaron que el uso de niveles terapéuticos con **ZnO** (3000ppm) aumentaba la concentración del mineral en el páncreas (130.9ppm).

Wang et al. (2010) señalaron que el utilizar niveles de **Zn** de 50ppm a 100ppm en el pienso, se reduce la concentración de **Zn** pancreático. Los valores de **Zn** descritos por estos autores son similares a los obtenidos por el tratamiento **ZnSO₄200** y el **ZnMet200**, lo cual sugiere que a mayor cantidad de **Zn** suministrada por estas fuentes que se han reportado como de similar biodisponibilidad, no se aumenta la concentración de **Zn** en el tejido del páncreas. **Brzovic et al. (1994)** ha establecido la importancia del **Zn** en las células β del páncreas, ya que parece que este mineral está relacionado con el almacenamiento de insulina y por tanto con el metabolismo energético.

5.8.3. Concentración mineral en hígados obtenidos de cerdos prepúberes

El contenido de **Zn** en hígado de lechones destetados, se observó estaba a niveles de 43.1ppm, pero al reducir la cantidad de **Zn** en la dieta el contenido en el tejido se reduce hasta en un 50% (**Burch et al., 1975**). Por su parte **Caine et al.** en el **2009** desarrolló una investigación en cerdas reproductores y obtuvo que

al utilizar un zinc quelatado con aminoácidos a 250ppm obtenía valores hepáticos de **648.4ppm**. En el estudio que realizaron **Rincker et al. (2005)** se observó que la concentración de **Zn** en hígado podía estar en 52.52ppm si no se suministraba **Zn** en la dieta. Pero al introducir una fuente de **Zn** (**ZnO** o **ZnMet**) a niveles terapéuticos (2000ppm), la concentración de **Zn** en hígado se aumentaba hasta 373.23ppm. Es evidente que los resultados obtenidos en esta investigación (**161.87ppm** a **294.65ppm**) están muy por debajo de los niveles reportados por los autores antes señalados, pero también es un hecho que el nivel incluido en la dieta fue de 150ppm y 200ppm de **Zn**. Por el contrario, los valores observados por **Davin et al. (2013)** fueron inferiores a los de este estudio (67ppm a 69ppm). Por su parte **Janczyk et al. (2015)** señalaron que al incrementar el nivel de **Zn** en la dieta, el hígado también incrementa su contenido, pero con el tiempo este se reduce, apoyando así el control adecuado del mineral circulante (**Peters et al., 2010**). También es importante señalar que el contenido de **Zn** en el hígado puede estar regulado por la actividad metabólica que ejerce el trabajo realizado por los animales. Esto con la finalidad de evitar un posible estado carencial. En particular el hígado es un órgano de control del **Zn** circulante, ya que almacena grandes cantidades para evitar problemas en ambos sentidos (carencia o exceso) (**Rojas et al., 1995; Spears, 1996; Krebs, 2000**).

5.8.4. Concentración mineral en riñones obtenidos de cerdos prepúberes

Burch et al. (1975) han señalado que la concentración de **Zn** en el riñón esta entre las 20ppm y las 25ppm. Estos resultados son muy similares a los obtenidos por **Rincker et al. (2005)** en lechones que no recibieron **Zn** en la dieta (19.33ppm), ya que con dietas a niveles terapéuticos la cantidad de **Zn** se mostró en ~8.5ppm. No obstante los valores reportados por los autores antes señalados, en la presente investigación se observó que la concentración de **Zn** era de entre 78.32ppm a 106.34ppm, siendo el primer valor el mostrado por el tratamiento **Control**. Por lo tanto en esta investigación los resultados indican una característica contraria a la reportada por **Rincker et al. (2005)**, quien a mayor cantidad de **Zn** suministrada, encuentra menor cantidad de **Zn** en el riñón. Por

otra parte los valores que fueron encontrados en este estudio están muy por encima de los que se han reportado en estudios previos. **Janczyk et al. (2014)** señalan que la cantidad de **Zn** en el riñón depende del nivel de **Zn** suministrado (122.3ppm a 372.7ppm). Así también del tiempo que dure el suministro, ya que se puede observar que la cantidad de **Zn** en el parénquima renal se reduce a menos en un 50%, una vez que transcurren seis semanas de suministro. Lo cual coincide con **Krebs (2000)**, ya que al final el organismo debe entrar en procesos de homeostasis, para evitar una intoxicación por este mineral.

En esta investigación se observó que la fuente mineral ejerce un efecto de concentración de **Zn** en el riñón. Los tratamientos que se utilizaron con **ZnO** en sus dos niveles, mostraron una concentración significativamente menor de **Zn** en el parénquima del riñón. Estos resultados pusieron a los tratamientos **ZnO150** y **ZnO200** en igualdad de concentración que el tratamiento **Control**. Si bien el tiempo juega a favor de la concentración de **Zn** encontrado en el tejido, también la fuente ejerce su efecto.

5.8.5. Concentración mineral en hueso (fémur) obtenidos de cerdos prepúberes y verracos jóvenes

El hueso se ha señalado como un buen indicador de la mineralización que guarda el organismo, y para la valoración de la biodisponibilidad de las fuentes de minerales empleadas en el pienso (**Brugger et al., 2014**), pero el hecho de aumentar el nivel de **Zn** en el pienso no garantiza un incremento significativo de **Zn** en los huesos (**Ott et al., 1966; Rojas et al., 1995**). Este efecto fue identificado en esta investigación en el periodo en el que se trataron a los cerdos prepúberes, ya que no se observaron diferencias en la concentración de **Zn** de los huesos, a pesar de que hay al menos 125ppm de **Zn** de diferencia entre el tratamiento **Control** con respecto a los tratamientos que contenían alguna fuente o nivel de **Zn**.

Las concentraciones de **Zn** observados en las muestras de hueso, fueron constantes, y de hecho los valores más cercanos fueron los que mostraron el **Control** (208.69ppm) y el **ZnMet200** (208.09ppm).

La concentración de **Zn** encontrada en huesos de ovejas tratadas con fuentes orgánicas e inorgánicas similares a las de este estudio mostraron valores de entre 83ppm a 97ppm (Rojas *et al.*, 1995). Por su parte Brugger *et al.* (2014), identificaron concentraciones similares a este estudio (180ppm a 239ppm) en fémur de lechones.

Sin embargo, al analizar la concentración de **Zn** en huesos de verracos jóvenes se observó que en ellos si se mostraba un comportamiento distinto del **Zn**, debido al efecto del tratamiento. En estos verracos se muestra como la cantidad de 25ppm de **Zn** en el tratamiento **Control**, logró reducir la concentración del mineral en el hueso un ~13%.

A diferencia de otros tejidos (riñón, hígado) el **Zn** depositado en el hueso se mantiene, si la cantidad de **Zn** consumido no cambia (Janczyk *et al.*, 2015). Este comportamiento también fue referido en este estudio (Interacción Tratamiento*Tiempo $P=0.032$).

5.8.6. Concentración mineral en testículos obtenidos de cerdos prepúberes y verracos jóvenes

Aunque el aparato reproductor no almacena grandes cantidades de **Zn**, el consumo de este mineral puede afectar la concentración presente en el tejido reproductivo. Evenson *et al.* (1993) demostró que los testículos provenientes de animales alimentados con bajas cantidades de **Zn**, generan una reducción del 11% de **Zn** en el parénquima de los testículos.

En esta investigación la concentración de **Zn** en el parénquima testicular mostró que el uso de fuentes inorgánicas y orgánica en el pienso de los cerdos prepúberes y de los verracos jóvenes, no contribuye a un aumento en la concentración de **Zn** en el parénquima testicular. Bedwal y Bahuguna (1994), mostraron que la concentración de **Zn** en los machos parece estar relacionada con la actividad sexual de los mismos, por lo que el contenido de este mineral en el parénquima testicular es mayor en los machos adultos que en los prepúberes. Sin embargo, en este estudio no existió diferencia entre prepúberes y verracos jóvenes.

Los valores de **Zn** encontrados en ambas etapas fueron muy similares, lo que sugiere que la edad de los animales no es un factor determinante para que el **Zn** aumente su concentración en el tejido. Sin embargo, **García et al. (2011)** observaron que un aumento en la concentración de **Zn** en la dieta, de 50ppm con una fuente **ZnMet**, puede aumentar el daño de las células espermáticas, ya que esta célula concentran mayor contenido de Zn en su estructura y esto genera daños en el movimiento de los espermatozoides y daños en la estructura del ADN nuclear.

La importancia del **Zn** en el testículo ha sido descrita por **Sankako et al. (2012)**. Estos autores han señalado que el mineral afecta el desarrollo de los túbulos seminíferos. Es probable que al no mostrar diferencias en el contenido de **Zn** en el parénquima testicular, este haya sido la razón por la que tampoco hubo diferencias en el **DTS**.

Franca et al. (2005) por su parte ha mostrado la importancia del desarrollo del túbulo seminífero, con respecto al desarrollo de las **CS**, sin embargo, es notorio el hecho de que en esta investigación, el tratamiento **Control** fuera quien tuvo una cantidad significativamente mayor de **CS**, comparado con las presentadas por los tratamientos que contenían fuente de **Zn**. Por lo que no queda claro si realmente la cantidad de **Zn** a niveles de 150ppm o 200ppm, podrían apoyar el desarrollo del túbulo seminífero y la cantidad de **CS**.

Por otra parte, al analizar la concentración de **Zn** con respecto a la concentración sanguínea de testosterona, se pudo observar que aquellos animales que consumieron el tratamiento **Control** (25ppm de **Zn**) mostraron una secreción menor de esta hormona. Lo cual coincide con los estudios de **Estienne et al., (2000)**, **Estienne et al. (2004)**, **Estienne y Harper, (2004)**, **Audet et al. (2009)**. Estos autores además han señalado la importancia que tiene que el testículo desencadene la producción y secreción de andrógenos y estrógenos por las células de Leydig y estrógenos e inhibina por parte de las **CS**, y para ello es necesario que exista **Zn**.

Por ello, es interesante identificar el hecho de que a pesar de no encontrar diferencias en la cantidad de **Zn** en el parénquima testicular, el uso de las fuentes de Zn, apoyó probablemente el desarrollo de las **CL** y de Sertoli, lo cual a su vez desencadenó el aumento de la concentración de testosterona.

5.8.7. Concentración mineral en epidídimos obtenidos de cerdos prepúberes y verracos jóvenes

Mawson y Fischer en 1951 determinaron la cantidad de **Zn** contenido en el epidídimo de ratas, obteniendo valores de 46.2mg g^{-1} de tejido, estos valores son inferiores a los observados en cerdos. Por su parte **Henkel et al. (2003)** describieron que en el epidídimo hay una distribución distinta del contenido de **Zn**, esto debido a dos proteínas que unen al **Zn** en la cabeza epididimal, lo cual se asocia a la capacidad que debe tener el epidídimo para guardar un equilibrio del mineral en el medio en donde se maduran las células espermáticas.

En esta investigación, el epidídimo no fue evaluado por secciones, por lo tanto la concentración de **Zn** obtenida fue de todo el tejido. Se pudo observar que la concentración del mineral en el epidídimo de cerdos prepúberes no se afectó por los tratamientos aplicados en este estudio. Sin embargo, en verracos jóvenes si fue encontrada una diferencia significativa.

El tratamiento **Control** en los verracos jóvenes fue mayor (68.14ppm) al mostrado por el resto de los tratamientos, en particular con los que utilizaron 200ppm de **Zn** y utilizaron **ZnSO₄** (54.26ppm) y **ZnO** (54.27ppm) como fuente. También se observó que la concentración de **Zn** en el epidídimo no mejoró con el uso de la fuente orgánica **ZnMet** a 150ppm (50.58ppm). Sin embargo, el tratamiento **ZnMet200** mantuvo una concentración tan alta como la que mostró el tratamiento **Control**.

En un estudio realizado por **García (2010)** se observó que ingresar **ZnMet** a 200ppm producía un aumento significativo de **Zn** (85.53ppm) en el epidídimo, y esta cantidad producía un daño en las células espermáticas que se estaban madurando en los epidídimos de verracos activos. Lo cual pone en duda si

realmente vale la pena ingresar una fuente de **Zn** orgánica a niveles tan altos como 200ppm.

Por su parte **Snaith et al. (1971)** y **Oldereid et al. (1993)** demostraron que a mayor edad en los individuos, se incrementa el nivel de **Zn** en el epidídimo. Sin embargo, estos datos no coinciden con los observados en esta investigación, ya que la concentración de **Zn** (ppm) en los cerdos prepúberes fue mayor que en los verracos jóvenes. No obstante, vale la pena señalar que los epidídimos de los verracos jóvenes fueron obtenidos a una edad menor a la que se considera como maduro o viejo el verraco (<2 años).

5.8.8. Concentración de Zn en plasma sanguíneo de cerdos prepúberes y verracos jóvenes

Los valores de **Zn** encontrados en el plasma sanguíneo no mostraron diferencias por efecto del tratamiento que contenía distinta fuente y nivel del mineral. Pero se observaron concentraciones de **Zn** similares a las reportadas por **Buff et al. (2005)**. En el estudio antes señalado, se incluyó una dieta con 150ppm de **Zn** orgánico, el cual produjo contenidos plasmáticos de 0.58mg mL⁻¹ a 0.97mg mL⁻¹ de **Zn**. Las diferencias observadas fueron debidas a la edad de los animales. En este caso las diferencias por periodo analizado no influyeron en la concentración de **Zn** plasmático. En ovejas también han sido probadas diferentes fuentes de **Zn**, incluidas las orgánicas (**ZnMet**), encontrando que la concentración plasmática de **Zn** es igual con **ZnMet** que con **ZnO** (0.87mg mL⁻¹), además observaron que el tratamiento **Control** (sin suplementación de **Zn**) no redujo la concentración de **Zn** en el plasma sanguíneo (**Puchala et al., 1999**). Estos resultados son coincidentes con los encontrados en esta investigación, ya que no influyo el utilizar fuentes orgánicas o inorgánicas en la concentración de **Zn** en el plasma sanguíneo, lo cual pone de manifiesto el fino control que ejerce el organismo para evitar que se concentre este mineral en la sangre, evitando un problema de intoxicación (**Linder, 1989**). De esta manera el **Zn** es de forma rápida, distribuido por las proteínas transportadoras, a los tejidos que lo necesiten, pero en particular el riñón debe ser capaz de eliminar a través de la orina, el **Zn** que no sea almacenado por los zincosomas (**Hernández, 2006**).

5.9. Evaluación del comportamiento durante el entrenamiento de verracos jóvenes

Closs et al. (2008) ha señalado que los verracos suelen ser criados con sistemas de alimentación poco estudiados, sin embargo esto afecta el bienestar físico de los animales, su capacidad de trabajo, y la calidad seminal, en aquellos verracos que lograron llegar a ser entrenados (**Flowers, 2008b**). Sin embargo, un 10% de verracos son eliminados durante su entrenamiento, por lo que es fundamental que sean capaces de aprender a montar el maniquí de extracción rápidamente y el eyaculado sea de calidad para su procesamiento. Se ha observado que la mayoría de las veces el comportamiento de los verracos está relacionado con la alimentación (**Camino et al., 2007**). Por ello **Closs (2002)** señaló que utilizar 100ppm de Zn, con fuentes orgánicas mejora el comportamiento productivo del verraco.

Flowers (2008b) señala que el desarrollo de las células de Sertoli es fundamental para que los verracos produzcan adecuadamente la espermatogénesis, por ello el cuidado previo a su entrenamiento es fundamental. Para que el verraco tenga libido no hay que olvidar que debe existir testosterona (**Flowers, 2008b**), pero la producción de esta hormona depende definitivamente de las células de Leydig. Estas a su vez parecen estar afectadas por el manejo prepuberal. Es por ello que se midió el efecto del Zn en el desarrollo de las CL, encontrando que existe un efecto significativo al utilizar las fuentes y niveles de Zn, y este efecto positivo también se demostró en las concentraciones de testosterona sanguínea.

Por otra parte **Flowers (2008b)**, ha observado que un verraco que haya sido criado en pequeños grupos, podrían tener un periodo de entrenamiento no mayor a 5 días, aunque un 75% de los verracos suelen ser entrenados en un periodo mayor a estos días. En este estudio, se puede señalar que los días ocupados para entrenar a los verracos estuvo entre los 4.8 a 9.5 días.

En tanto que **Terlouw et al. (2008)** sugieren que los verracos deben ser capaces de montar en un tiempo no mayor a 7min, aunque es frecuente que el tiempo sea mayor (10min). Sin embargo, el verraco ocupa un tiempo antes del salto, el cual es de aproximadamente de 2.7min. En esta investigación los

verracos ocuparon entre 4.75min a 17.2min para eyacular, lo cual indica que se ocupó al menos 2min más para que el verraco produjese un eyaculado.

La testosterona es la hormona más estrechamente vinculada con el deseo sexual o libido, por lo que concentraciones bajas de esta hormona provocan que los machos no muestren ningún interés sexual. Pero existe evidencia que animales con niveles normales de testosterona muestran una disminución en la libido, por lo que seguramente la experiencia sexual previa, el manejo, salud, operativo pueden ser factores para que los verracos se nieguen a trabajar adecuadamente (**Flowers, 2008**).

CONCLUSIONES.

El uso de fuentes inorgánicas y orgánicas de Zn en el pienso no afectó el consumo de pienso de los cerdos prepúberes. Pero en verracos jóvenes si cambio el patrón de consumo, reduciéndolo con el uso de la fuente ZnSO_4 a 200ppm de Zn.

La ganancia diaria de peso de los cerdos prepúberes fue afectada por el uso de las fuentes de Zn. En Crecimiento la fuente oxidada mejoró la ganancia diaria de peso. Sin embargo, este efecto positivo no se presentó en los periodos de Desarrollo y Finalización. En el caso de los verracos jóvenes el peso y condición corporal se vio favorecida por el consumo del ZnO_{200} .

La morfometría testicular fue afectada por el pienso que contenía 25ppm de Zn, ya que se redujo el número de células de Leydig tanto en los cerdos prepúberes, como en los verracos jóvenes.

La concentración de testosterona sanguínea mostro una significativa relación con el número de células de Leydig, pero no así con las células de Sertoli.

El número de células de Sertoli, fue significativamente mejorado por el tratamiento que no contenía Zn complementario al pienso base.

En cuanto al diámetro tubular testicular no mostro estar afectado por ningún tratamiento, pero si se identificó un efecto de edad, ya que los verracos jóvenes presentaron un mayor diámetro.

El comportamiento de los verracos al momento de ser entrenados, mostro que la fuente de Zn azufrada aumenta el tiempo y la intensidad de entrenamiento, logrando prolongar este al doble que el resto de los tratamientos.

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. **Abdel-Mageed**, A.B., Oehme F. W. 1990a. A review of the biochemical roles, toxicity, and interactions of zinc, copper, and iron: I. Zinc. *Vet. Hum. Toxicol.* 32:34–39.
2. **Abdel-Mageed**, A.B., Oehme F. W. 1990b. A review on biochemical roles, toxicity, and interactions of zinc, copper, and iron: IV. Interactions. *Vet. Hum. Toxicol.* 32:456–458.
3. **Acda** S.P., y Chae B.J. 2002. A review on the applications of organic trace minerals in pig nutrition. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(1), 25-30.
4. **Aguilera-Reyes** U., García López G.I., Zavala Paramo G.I., Monroy Vilchis O., Pescador Salas N. 2006. Elección precopulatoria y conducta copulatoria en cerdos Yorkshire, York-Landrace y Landrace. *Acta Zoológica Mexicana* (nueva serie); 2263-73. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=57522104>.
5. **Allrich** R.D., Christenson R.K., Ford J.J., Zimmerman D.R. 1983. Pubertal development of the boar: age-related changes in testicular morphology and in vitro production of testosterone and estradiol-17 beta. *Biol Reprod.* 28(4):902-9.
6. **Almeida** F.L., Leal M.C., França L.R. 2006. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biology of Reproduction.* 75 (5): 792–799.
7. **Althouse** G.C. 2007. Chapter 97. Artificial Insemination in Swine: Boar Stud Management. In: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (Second Edition). Edited by: Youngquist R.S., Threlfall W.R. pp. 731- 738. Copyright © Elsevier Inc. All rights reserved. ISBN: 978-0-7216-9323-1.
8. **Araújo** M.S de, Barreto S.L de Toledo, Donzele J.L., Oliveira, R.F.M. de, Umigi R.Tie., Oliveira W.P de, Balbino E.M., Assis A.P de., Maia G.V. C. 2007. Níveis de cromo orgânico na dieta de codornas japonesas mantidas em estresse por calor na fase de postura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(3), 584-588.
9. **Arthington** J.D., Corah L.R., Hill D.A. 2002. Case study: The Effects of Dietary Zinc Concentration and Source on Yearling Bull Growth and Fertility. *The Professional Animal Scientist.* 18:282–285.
10. **Ashmead** H.D. 1993. Comparative intestinal absorption and subsequent metabolism of metal amino acid chelates and inorganic metal salts. *The Roles of Amino Acid Chelates in Animal Nutrition*. HD Ashmead, ed. Noyes Publications, Park Ridge, NJ, 47-75.

11. **At-Taras** E.E., Berger T., McCarthy M.J., Conley A.J., Nitta-oda B.J., Roser J.F. 2006. Reducing Estrogen Synthesis in Developing Boars Increases Testis Size and Total Sperm Production. *Journal of Andrology*, Vol. 27, No. 4: 552–559.
12. **Audet**, I., Laforest, J. P., Martineau, G. P., & Matte, J. J. (2004). Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. *Journal of animal science*, 82(2), 626-633.
13. **Audet** I., Bérubé N., Bailey J.L., Laforest J-P., Quesnel H., Matte J.J. 2009. Effects of dietary vitamin supplementation and semen collection frequency on hormonal profile during ejaculation in the boar. *Theriogenology* 71 (2); 334–341.
14. **Auld** D.S. 2001. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *BioMetals* 14 (3-4): 271–313.
15. **Balfagón-Romeo** A. 2006. Nutritional approach to mineral over-supplementation in grow-finish pigs: organic trace minerals and phosphorus body accretion. Thesis: Master of Science in the College of Agriculture at the University of Kentucky. pp. 99.
16. **Bassols** J., Kádár E., Briz M., Pinart E., Sancho S., Garcia-Gil N., Badia E., Pruneda A., Bussalleu E., Yeste M., Casas I., Dacheux J.L., Bonet S. (2005). Evaluation of boar sperm maturation after co-incubation with caput, corpus and cauda epididymal cultures Evaluation of boar sperm maturation in vitro. *Theriogenology* 64 (9): 1995–2009.
17. **Benton** L., Shan L-X., Hardy M.P. 1995. Differentiation of Adult Leydig Cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* Vol. 53, No. 1-6, pp. 61-68.
18. **Berger** L.L. 2006. Salt and Trace Minerals for Livestock, Poultry and Other Animals. Printable version. ©Copyright. Published by the Salt Institute. Alexandria, Virginia. All Rights Reserved.
19. **Bernardi** S., Brogliatti G, Oyarzabal M.I. 2010. Testicular Structure and Semen Quality in Mice Lines Selected for Weight. *International Journal of Morphology*, 28(3), 673-680.
20. **Bertani** G.R., Scheid I.R., Irgang R., Barioni Jr. W., Wentz I., Afonso S.B. 2002. Gonadal sperm reserve in purebred Landrace and Large White boars of high average daily gain. *Theriogenology* 57(2): 859–67.
21. **Björndahl** L., Kvist U. 2011. A model for the importance of zinc in the dynamics of human sperm chromatin stabilization after ejaculation in relation to sperm DNA vulnerability. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 57: 86–92.
22. **Briz** M.D., Bonet S., Pinart B., Egozcue J., Camps R. 1995. Comparative study of boar Sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. *J. Androl.* Vol. 16, No. 2. 175-88.

23. **Brzóśka** M.M., Moniuszko-Jakoniuk J. 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food and Chemical Toxicology* 39; 967–980.
24. **Buff** C.E., Bollinger D.C., Ellersieck M.R., Brommelsiek W.A., Veum T. L. 2005. Comparison of growth performance and zinc absorption, retention, and excretion in weanling pigs fed diets supplemented with zinc-polysaccharide or zinc oxide. *J.Anim. Sci.* 83:2380-2386.
25. **Burkett** J.L., Stalder K.J., Powers W.J., Bregendahl K., Pierce J.L., Baas T.J., Bailey T., Shafer B.L. 2009. Effect of inorganic and organic trace mineral supplementation on the performance, carcass characteristics, and fecal mineral excretion of phase-fed, grow-finish swine. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences.* 22, (9): 1279-1287.
26. **Camara** F. y Amaro C.A. 2003. Nutritional aspects of zinc availability, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 54, 143-152.
27. **Camino** Y., Abeledo C., Tolón N., Ramírez M., Acosta M.J., González F. 2007. Nota sobre la influencia de la alimentación en la conducta sexual de verracos jóvenes. *Revista Computarizada de Producción Porcina.* 14(3):208-210.
28. **Campo** M.L. 2009. Chapter: Apoptosis. Book *Apoptosis: Involvement of Oxidative Stress and Intracellular Ca²⁺ Homeostasis*. Springer eBook. pp 17-55. Print ISBN 978-1-4020-9872-7.
29. **Carlson** D., Poulsen H.D. 2003. Dietary zinc enhances gastrointestinal function in pigs after weaning, p. 229-231. In R. O. Ball (ed.), *Proceedings of the 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*, vol. 2. University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.
30. **Cavinder** C.A., Zoller J.L., Briers G., Sigler D.H. 2010. Sexual behavior and blood hormone profiles around the time of ejaculation and subsequent sperm characteristics in stallions. *Professional Animal Scientist. ProQuest Biology Journals.* Oct; 26, 5; pg. 540- 546.
31. **Chamberlain** T.S., Hughes P.E. 1996. The influence of mating frequency and nutrition the stimulus value of boars. *Animal Reproduction Science.* 43 (2-3); 151-160.
32. **Chanmugam** P., Wheeler C., Hwang D.H. 1984. The effect of zinc deficiency on prostaglandin synthesis in rat testes. *Journal of Nutrition* 114, 2066-2072.
33. **Chandrashekar** V., Bartke A. 2007. Growth factors in Leydig cell function. The Leydig cell in health and disease. *Contemporary Endocrinology*, 2007, IV, 263-277,
34. **Cheng** T., Fakler T, Rapp C, Ward T. 2005. Organic versus Inorganic Trace Minerals in Poultry: The Zinc Experience. 32nd Annual Carolina Poultry Nutrition Conference. October 27, pp.101-106.

35. **Christensen** A.K. 1965. The fine structure of testicular interstitial cells in guinea pigs. *J. Cell Biol.*, 26:911-935
36. **Christianson** D.W. y Cox, J.D. 1999. Catalysis by metal-activated hydroxide in zinc and manganese metalloenzymes. *Annual review of biochemistry*, 68(1), 33-57.
37. **Close** W.H. 1993a. Nutrition of the working boar. *Recent Development in Pig nutrition 2*. Nottingham University Press. pp. 347-370.
38. **Close** W.H. 2002. Trace mineral nutrition in pigs: working within the new recommendations. In: 'Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries: Proceedings of Alltech's 18th Annual Symposium. pp 401-406. Edited by T.P. Lyons and K.A. Jacques. Nottingham University Press, Nottingham.
39. **Close** W.H. 2008. Nutritional requirements and responses of the breeding boar. Midwest boar stud managers conference. St. Louis Missouri. USA. Pp 65-73
40. **Costa** D.S., Silva J.F.S. 2006. Wild boars (*Sus scrofa scrofa*) seminiferous tubules morphometry. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(5), 739-745.
41. **Costa** D.S., Faria F.J. Fernandes C.A., Silva J.C., Auharek S.A. 2013. Testis morphometry and kinetics of spermatogenesis in the feral pig (*Sus scrofa*). *Animal reproduction science*, 142(1), 63-70.
42. **Cousins** R.J. 1996. Zinc. In: Ziegler E.E. and Filer L.J. Jr, eds. *Present Knowledge in Nutrition*, 7th edition. Washington, DC: ILSI Press, 293-306.
43. **Cousins**, R. J., & McMahon, R. J. 2000. Integrative aspects of zinc transporters. *The Journal of nutrition*, 130(5), 1384S-1387S.
44. **Creech** B.L., Spears J.W., Flowers W.L., Hill G.M., Lloyd K.E., Armstrong T.A., Engle T.E. 2004. Effect of dietary trace mineral concentration and source (inorganic vs. chelated) on performance, mineral status, and fecal mineral excretion in pigs from weaning through finishing. *J Anim Sci*. 82:2140-2147.
45. **Croxford** T.P., McCormick N.H., Kelleher S.L. 2011. Moderate Zinc Deficiency Reduces Testicular Zip6 and Zip10 Abundance and Impairs Spermatogenesis in Mice. *The Journal of Nutrition*. 141 (3): 359-365.
46. **Cupic** Z., Cupic Z., Sinovec Z., Veselinovic Snezana, Ivkov Olivera, Veselinovic S., Medic D., Ivancev N., Grubac S. 1998. The effect of dietary zinc, on semen quality in Holstein-Friesian bulls. 4th International Symposium on Animal Reproduction, Ohrid, Macedonia. Proceedings, page 96.
47. **Davis**, M.E., Brown, D.C., Maxwell, C.V., Johnson, Z.B., Kegley, E.B., Dvorak, R.A., 2004. Effect of phosphorylated mannans and pharmacological additions of zinc oxide on growth and immunocompetence of weanling pigs. *J. Anim. Sci*. 82, 581–587.

48. **De Alba** Romero C. 2008. Better boar training. Pig Progress. Vol 24. No. 10.
49. **De Alba** Romero C. 2008. Entrenamiento del verraco para la producción de dosis seminales en centros de inseminación artificial. Minitub. AVANCES, Volumen V, Página(s): 42-63. ISSN: 16972015
50. **De Alba** Romero C. 2010. Protocolo práctico para la valoración de verracos destinados a la producción de dosis seminales. Av. Tecnol. Porc. VI (5): 31-41.
51. **de Blas** C., Mateos G.G., García-Rebollar P. 2010. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Tercera edición. Madrid, España.
52. **De Loera** OY, García AC, Guevara GJA, Palomo YA, Martínez AA, García-Contreras AC. 2011. Efecto de la fuente y nivel de Zn en el desarrollo de las células de Leydig de verracos en la etapa de crecimiento. XV Congreso Bienal AMENA. 8 al 21 de Octubre, Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero, México.
53. **Diekman** M.A., Green M.L. 1992. Mycotoxins and Reproduction in Domestic Livestock. J. Anim. Sci. 70:1615-1627.
54. **Dissanayake** D.M.A.B., Wijesinghe P.S., Ratnasooriya W.D., Wimalasena S. (2010). Relationship between seminal plasma zinc and semen quality in a subfertile population. Journal of human reproductive sciences, 3(3), 124.
55. **Dolan** C.E. 2004. Structural and Functional Studies of the Protamine 2-Zinc Complex from Syrian Gold Hamster (*Mesocricetus Auratus*) Spermatids and Sperm. Thesis Doctoral. For the degree of Doctor of Philosophy in Biochemistry and Molecular Biology from the University of California, Davis.
56. **Domínguez** J.C., Cisale H.; Alegre B., González R., Peláez J., García J.C., Tejerina F., Bernal S., Cardenas S., Córdova C.A., Abad M., Abad F., Martín D. 2009. Diseño de las instalaciones del CIAP. SUIIS N° 61 Octubre, pág. 58-65.
57. **Ebert** J.C., y Altman R.B. 2008. Robust recognition of zinc binding sites in proteins. Protein Science, 17(1), 54-65.
58. **Einarsson** S., Andersson K., Wallgren M., Lundström K., Rodríguez-Martínez H. 2009. Short- and long-term effects of immunization against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac™, on sexual maturity, reproductive organs and sperm morphology in male pigs. Theriogenology 71 (2); 302–310.
59. **Estienne** M.J., Harper A.F. 2001. Techniques for Training Boars for Semen Collection. *Livestock Update*, Virginia Cooperative Extension. <http://www.thepigsite.com/articles/510/techniques-for-training-boars-for-semen-collection>

60. **Estienne** M.J., Harper A.F. 2004. **Prostaglandins and Boars. Livestock Update**, Virginia Cooperative Extension. http://www.sites.ext.vt.edu/newsletter-archive/livestock/aps-04_11/aps-383.html
61. **Estienne** M.J., Barb C.R. 2005. The control of adenohipophysial hormone secretion by amino acids and peptides in swine. *Domestic Animal Endocrinology. Farm Animal Endocrinology Special Issue Part 1*. 29 (1); 34–42.
62. **Estienne** M.J., Harper A.F., Speight S.M., Crawford R.J., Barb C.R. 2009. Effect of naloxone treatment on luteinizing hormone and testosterone concentrations in boars with high and low libido. *Reproductive Biology* 9 (3): 241-252.
63. **Everitt**, B.J., 1990. Sexual motivation: a neural and behavioural analysis of the mechanisms underlying appetitive and copulatory responses of male rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14 (2); 217–232.
64. Fabré Delgado R. 2011. Las hormonas como herramienta de manejo y de bienestar animal. *Revista ANAPORC. Órgano oficial de la Asociación de porcicultura científica. Año VIII*. 78; pp. 46.
65. **Falchuk** K.H. 1998. The molecular basis for the role of zinc in developmental biology. *Molecular and Cellular Biochemistry* 188 (1-2): 41–48.
66. **Falchuk** K.H., **Montorzi** M. 2001. Zinc physiology and biochemistry in oocytes and embryos. *BioMetals* 14 (3-4): 385-395.
67. **Favier** A.E. 1992. The Role of Zinc in Reproduction Hormonal Mechanisms. *Biological Trace Element Research. Vol. 32. Num. 1-3*, 363-382.
68. **Favier** M., Hininger-Favier I. 2005. Thérapeutique: Zinc et grossesse. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 33 (4): 253–258.
69. **FEDNA**. 2006. Necesidades nutricionales para ganado porcino: Normas FEDNA. Fundación Española para el desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España.
70. **FEDNA**. 2013. Necesidades nutricionales para ganado porcino: Normas FEDNA. Fundación Española para el desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España.
71. **Ferlin** A., Garolla A., Rigon F., Rasi Caldogno L., Lenzi A., Foresta C. 2006. Changes in serum insulin-like factor 3 during normal male puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* Sep; 91(9):3426-31.
72. **Flowers** W.L. 2005. Anatomía y fisiología del verraco. *Revista ANAPORC. Avances en Tecnología Porcina*. 2(2) p. 40-51.
73. **Flowers** W.L. 2008. Anatomy and physiology of the boar. Midwest boar stud managers conference. St. Louis Missouri. USA. Pp 65-73
74. **Flowers** W.L. 2008. Genetic and phenotypic variation in reproductive traits of AI boars. *Theriogenology* 70 (8); 1297–1303.

75. **Ford J.J.** 1990. Differentiation of sexual behavior in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 40: 311-321.
76. **Ford J.J., Wise T.H., Lunstra D. D.** 1997. Negative relationship between blood concentrations of follicle-stimulating hormone and testicular size in mature boars. *J Anim Sci.* 75:790-795.
77. **Ford JJ, McCoard SA, Wise TH, Lunstra DD, Rohrer GA.** 2006. Genetic variation in sperm production. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*;62: 99-112.
78. **Ford J.J., Wise T.H.** 2009. Sertoli cell differentiation in pubertal boars. *J Anim Sci.* 87:2536-2543.
79. **Ford J.J., Wise T.H.** 2011. Assessment of pubertal development of boars derived from ultrasonographic determination of testicular diameter. *Theriogenology* 75 (2); 241–247.
80. **Formigari A., Irato P.** 2007. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* Volume 146, Issue 4, Pages 443-459.
81. **França L.R., Silva, Jr. V.A., Chiarini-Garcia H., Garcia S.K., Debeljuk L.** 2000. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biology of Reproduction.* 63, 1629–1636.
82. **França L.R., Avelar G.F., Almeida F.F.** 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 63(2), 300-318.
83. **Franklin R.B., Costello L.C.** 2009. The Important Role of the Apoptotic Effects of Zinc in the Development of Cancers. *J Cell Biochem.* April 1; 106(5): 750–757.
84. **Fredriksen B., Lium B.M., Marka C.H., Mosveen B., Nafstad O.** 2008. Entire male pigs in farrow-to-finish pens—Effects on animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science.* 110 (3); 258–268.
85. **Frydrychová S., Opletal L, Macáková K., Lustyková A., Rozkot M., Lipenský J.** 2011. Effects of Herbal Preparation on Libido and Semen Quality in Boars. *Reproduction in Domestic Animals*, 46: no. 2.
86. **García C.A.C., Amaya S., Guevara G.J.** 1999. Entrenamiento de verracos utilizados en monta natural y posteriormente en potro para I.A. 3er Congreso Nacional de la SOMEV. 13 y 14 de diciembre. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México.
87. **García Artiga C., Lléo Casanova B., Pérez García T.** 2001. Manejo de verracos para su utilización en inseminación artificial. Capítulo IV. *Revista/Libro Porci: Manejo y gestión de centros de inseminación artificial porcina.* Número 62. ed.

- Madrid - España: Tratado De Ganado Porcino. Monografía de actualidad. Aula Veterinaria. Ediciones Luzan5 S.A. España, Pág. 45-54.
88. **García-Contreras** A.C., De Loera O. Y. **2007**. Nutrição do reproductor suíno. Suínos & Cia revista Técnica da Suinocultura. Ano IV- nº 22; 13. Pp.10-20 Brasil. ISSN. 13073-270.
89. **García-Contreras** A.C., De Loera O.Y., García-Artiga C., Palomo A., Guevara-González J.A., Herrera H.J. López-Fernández C., Gosálvez J. 2010. High levels of dietary Zn-Methionate increase sperm DNA fragmentation in the boar: A preliminary investigation. 21st International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. Vancouver, Canadá. Pag. 1072.
90. **García Contreras**, A.C. 2010. Efecto de la fuente de Zinc en la morfometría testicular y epididimaria, así como su relación con la producción y calidad seminal del verraco. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España. ISBN: 978-84-694-2678-4
91. **García-Contreras** A., De Loera Y., García-Artiga C., Palomo A., Guevara J.A., Herrera-Haro J., López-Fernández C., Johnston S., Gosálvez J. 2011. Elevated dietary intake of Zn-methionate is associated with increased sperm DNA fragmentation in the boar. Reproductive Toxicology. 31(4); 570–573.
92. **Garcés** C., Díaz R.J., Ubiedo E., Torres A. 1996. Funcionalidad y diseño de alojamientos porcinos en sistema intensivo. Capítulo II. Revista/Libro Porci: Alojamientos e Instalaciones Número 36. ed. Madrid - España: Tratado De Ganado Porcino. Aula Veterinaria. Ediciones Luzan5 S.A. España, p.25-39.
93. **Gaudré** D., Quiniou N. 2009. What mineral and vitamin levels to recommend in swine diets? R. Bras. Zootec., v.38, p.190-200, 2009 (supl. especial).
94. **Geiger**, Tammy Lynn. 1997. Leydig cell development in boars. Thesis Masters. Texas Tech University Department Animal and Food Sciences.
95. **Geiger** T.L., Khan M., Whisnanta C.S., Prien S.D., Khan S.A. 1999. Regulation of DNA synthesis in leydig cells obtained from neonatal pig testes. Domestic Animal Endocrinology 17 (1); 65–75.
96. **GfE** (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie), Ausschluß für Bedarfsnormen (1987): Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Schweine. DLG-Verlag, Frankfurt (Main).
97. **Gillespie** J.R., Flanders F.B. 2010. Modern Livestock and Poultry Production. 8th Edition. Chapter 9. Genetic of Animal Breeding. Publisher: Delmar Cengage Learning ©2010. Pages: 1136. ISBN-13: 978-1-4283-1808-3

98. **Haeussler S.**, Claus R. 2007. Expression of the glucocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 in pig testes cells along fetal development. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(5), 664-669.
99. **Hafez, E.SE.** (2000) Reproducción e inseminación artificial en animales. Mc Graw-Hill. México.
100. **Hänsch R** y Mendel, R.R. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current opinion in plant biology*, 12(3), 259-266.
101. **Harper A.**, Forsyth D. 2006. Relative value of feedstuffs for swine. Factsheet Pork Information Gateway. Originally published as PIH- 112. U.S, Pork Center of Excellence. Available at: www.porkgateway.org
102. **Hellman H.** y Carlson M. 2003. Feeding organic and inorganic sources of trace minerals for swine production. University of Missouri Extension publication.
103. **Hellman**, Neville F. 2010. Chapter 16. Zinc. *Mineral Nutrition of Livestock*, 4th Edition. CAB International. Pag. 426-400. ISBN-13: 978 1 84593 472 9.
104. **Hemsworth P.H.**, Verge J., Coleman G.J. 1996. Conditioned approach-avoidance responses to humans: the ability of pigs to associate feeding and aversive social experiences in the presence of humans with humans. *Applied Animal Behaviour Science*. Volume 50, Issue 1, Pages 71-82.
105. **Hemsworth P.H.**, Tilbrook A.J. 2007. Sexual behavior of male pigs. *Hormones and Behavior* 52 (1); 39–44.
106. **Hennig B.**, Meerarani P., Ramadass P., Toborek M., Malecki A., Slim R., McClain C.J. 1999. Zinc nutrition and apoptosis of vascular endothelial cells: implications in atherosclerosis. *Nutrition* 15 (10); 744–748.
107. **Hernández A.** 2006. Influence of the form and level of organic versus inorganic copper and zinc in diets for growing and finishing pigs. Thesis Master of Philosophy. Division of Health Sciences School of Veterinary and Biomedical Sciences. Murdoch University, Australia.
108. **Hernández A.**, Pluske J.R., Souza D.N.D., Mullan B.P. 2008. Levels of copper and zinc in diets for growing and finishing pigs can be reduced without detrimental effects on production and mineral status. *Animal*. 2, (12):1763-1771.
109. **Hernández A.**, Pluske J.R., Souza D.N.D., Mullan B.P. 2009. Minimum levels of inclusion of copper and zinc proteinate amino acid chelates in growing and finishing pig diets. *Animal Production Science*. 49, (4): 340–349.
110. **Hermo L.**, Robaire B. 2002. Epididymal cell types and their functions. *The epididymis: from molecules to clinical practice*. Academic/ plenum publishers. Pàg. 61. Edited by Bernard Robaire and Barry T. Hinton.

111. **Hesketh** J.E. 1982. Effects of dietary zinc deficiency on Leydig cell ultrastructure in the boar. *Journal of Comparative Pathology*, 92(2), 239-247.
112. **Hill** D.A., Peo E.R., Lewis A.J., Crenshaw J.D. 1986. Zinc-amino acid complexes for swine. *Journal of Animal Science*, 63(1), 121-130.
113. **Hirano** T., Murakami M., Fukada T., Nishida K., Yamasaki S., Suzuki T. 2008. Roles of Zinc and Zinc Signaling in Immunity: Zinc as an Intracellular Signaling Molecule. *Advances in Immunology*. Volume 97. Pages 149-176.
114. **Hoagland** T.A., Diekman M.A. 1982. Influence of supplemental lighting during increasing daylength on libido and reproductive hormones in prepubertal boars. *J. Anim. Sci.* 55:1483-1489.
115. **Horton** N.D., Mamiya B.M., Kehrer J.P. 1997. Relationships between cell density, glutathione and proliferation of A549 human lung adenocarcinoma cells treated with acrolein. *Toxicology*. 26; 122(1-2):111-22.
116. **Hostetler** C.E., Kincaid R.L., Mirando M.A. 2003. The role of essential trace elements in embryonic and fetal development in livestock. *Vet J.* 166(2):125-39.
117. **Huang** Y-T., Johnson R.K. 1996. Effect of selection for size of testes in boars on semen and testis traits. *J. Anim. Sci.* 74:750-760.
118. **Hughes** P.E., Varley M.A. 1984. Reproducción del cerdo. Edit. Acribia. Zaragoza.
119. **Hull** E.M., Meisel R.L., Sachs B.D. 2002. Male sexual behavior. In: Pfaff, D.W., Arnold, A.P., Etgen, A.M., Fahrbach, S.E., Rubin, R.T. (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior*, vol. 1. Academic Press, New York, pp. 3–137.
120. **Hull** E.M., Dominguez J.M. 2007. Sexual behavior in male rodents. *Reproductive Behavior in Farm and Laboratory Animals*, 11th Annual Meeting of the Society for Behavioral Neuroendocrinology. *Horm. Behav.* 52 (1); 45–55.
121. **Hull**, E.M., Dominguez, J.M., 2006. Getting his act together: roles of glutamate, nitric oxide, and dopamine in the medial preoptic area. *Brain Res.* 1126 (1); 66–75.
122. **Hull** E.M., Wood R.I., McKenna K.E. 2006. Chapter 33. Neurobiology of Male Sexual Behavior. In: Knobil y Neill's. *Physiology of Reproduction*, 3rd. Edition. Edited by Neill J.D. pp: 1729-1824. Copyright © Elsevier Inc. All rights reserved. Pages: 3296. Hard Cover (2-Vol Set). ISBN: 0125154003
123. **Hull** E.M., Rodríguez-Manzo G. 2009. Chapter 1. Male Sexual Behavior. *Mammalian hormone-behavior systems. Hormones, Brain and Behavior*. Volume 1. pp: 5-65. Copyright © Elsevier Inc. All rights reserved.
124. **leuan** A. Hughes M.D Chapter 16. The Testes: Disorders of Sexual Differentiation and Puberty in the Male. *Pediatric Endocrinology* (3rd Edition). 2006, Pages 662-685.

125. **Iguchi** K., Otsuka T., Usui S., Ishii K., Onishi T., Sugimura Y., Hirano K. 2004. Zinc and Metallothionein Levels and Expression of Zinc Transporters in Androgen-Independent Subline of LNCaP Cells. *Journal of andrology*, 25(1), 154-161.
126. **Jacela** J.Y., DeRouchey J.M., Tokach M.D., Goodband R.D., Nelssen J.L., Renter D.G., Dritz S.S. 2010. Practice tip Peer reviewed Feed additives for swine: Fact sheets–prebiotics and. *J Swine Health Prod*, 18(3), 132-136.
127. **Jackson** K., Valentine R., Coneyworth L., Mathers J., Ford D. 2008. Mechanisms of mammalian zinc-regulated gene expression. *Biochemical Society Transactions*, 36(6), 1262.
128. **Jing** M.Y., Sun J.Y., Weng X.Y. 2007. Insights on zinc regulation of food intake and macronutrient selection. *Biol Trace Elem Res*. 115(2):187-94.
129. **Johnson** F.O., Gilbreath E.T., Ogden L., Grahamd T.C., Gorham S. 2011. Reproductive and developmental toxicities of Zinc supplemented rats. *Reproductive Toxicology* 31 (2); 134–143.
130. **Kambe** T., Tsuji T., Hashimoto A., Itsumura N. 2015. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev*. 95(3):749-84.
131. **Karunakaran** M., Mondal M., Rajarajan K., Karmakar H.D., Bhat B.P., Das J., Bora B., Baruah K.K., Rajkhowa C. 2009. Early puberty in local Naga boar of India: Assessment through epididymal spermiogram and *in vivo* pregnancy. *Animal Reproduction Science* 111; 112–119.
132. **Kato** S., Siqin, Minagawa I., Aoshima T., Sagata D., Konishi H., Yogo K., Kawarasaki T., Sasada H., Tomogane H., Kohsaka T. 2010. Evidence for expression of relaxin hormone-receptor system in the boar testis. *Journal of Endocrinology* 207, 135–149.
133. **Katz** L.S. 2007. Sexual behavior of domesticated ruminants. *Behavior in Farm and Laboratory Animals*, 11th Annual Meeting of the Society for Behavioral Neuroendocrinology Hormones and Behavior 52 (1); 56–63.
134. **Kemp** B., den Hartog, L.A., Grooten, H.J.G. 1989. The effect of feeding level on semen quantity and quality of breeding boars. *Anim. Reproduction. Sci.* 20(4); 245-254.
135. **Kemp** B. 1991. Nutritional strategy for optimal semen production in boars. *Pig News and Information*. 12; 555-558.
136. **Kim** B.G., Lindemann M.D. 2007. REVIEW: An overview of mineral and vitamin requirements of swine in the National Research Council (1944 to 1998) Publications. *The Professional Animal Scientist* 23:584–596.
137. **Kimura** E., **Aoki** S. 2001. Chemistry of zinc (II) fluorophore sensors. *BioMetals* 14: 191–204.

138. **Khalaf** G., Fahmy H.F., Saleh H.A. 2014. Effect of a zinc-free diet from weaning through puberty on the structure of the testis in albino rats, with a special focus on the Leydig cells. *Egyptian Journal of Histology*, 37(2), 304-315.
139. **Klasing** K.C., Goff J.P., Greger J.L. King J.C., Lall S.P., Lei X.G., Linn J.G., Nielsen F.H., Spears J.W. 2005. *Mineral Tolerance of Animals*. 2nd ed. National Academics Press, Washington DC. ISBN: 0309096545. p.413-427. (Mineral tolerance of animals / Committee on Minerals and Toxic Substances, Board on Agriculture and Natural Resources, Division on Earth and Life Studies.-2nd rev. ed.).
140. **Kongsted** A.G., Hermansen J.E. 2008. The mating behavior and reproduction performance in a multi-sire mating system for pigs. *Theriogenology* 69; 1139–1147.
141. **Kozink** D.M., Estienne M.J., Harper A.F., Knight J.W. 2002. The effect of lutalyse on the training of sexually inexperienced boars for semen collection. *Theriogenology*. 58 (5); 1039-1045.
142. **Kumaresan** A., Bujarbaruah K.M., Kadirvel G., Khargharia G., Sarma R.G., Goswami J., Basumatary R., Palaniappan K., Bardoloi R.K. 2011. Early sexual maturity in local boars of Northeastern India: Age-related changes in testicular growth, epididymal sperm characteristics and peripheral testosterone levels. *Theriogenology*. 75 (4): 687–695.
143. **Kuster** C.E., Althouse G.C. 2006. Chapter 94. Reproductive Physiology and Endocrinology of Boars. In: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (Second Edition). Edited by: Youngquist R.S., Threlfall W.R. pp. 717-721. Copyright © Elsevier Inc. All rights reserved. ISBN: 978-0-7216-9323-1.
144. **Laity** J.H., Lee B.M., Wright P.E. 2001. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology*. 11 (1): 39–46.
145. **Lattanzio** F., Malavolta M., Mocchegiani E. 2008. Nutrient (zinc and vitamin E)-gene interactions related to inflammatory and antioxidant response in aging and inflammation. *Nutritional Therapy & Metabolism* / 26, (3): 118-128.
146. **Lewis** J., Lee Southern L. 2001. *Swine Nutrition*. 2nd ed. CRP Presss. ISBN 0-8493-0696-5
147. **Lacorn** M., Bauer A., Claus R. 2009. Is the early postnatal rise of testosterone responsible for a later male pattern of growth hormone secretion in pigs?. *Theriogenology*. 72, (5): 636-642.

148. **Lee** K.H., Diekman M.A., Brandt K.E., Grieger D.M., Allrich R.D. 1987. Hormonal patterns of boars exposed to natural or supplemental lighting during pubertal development. *J. Anim. Sci.* 64, (4): 1110-1116.
149. **Levis** D.G., Leibbrandt V.D., Rozeboom D.W. 1997. Development of gilts and boars for efficient reproduction. Published in the pork industry handbook. Cooperative Extension Service, Michigan State University. Extension Bulletin E-Reproduction. p. 8.
150. **Levis** D.G., Reicks D.L. 2005. Assessment of sexual behavior and effect of semen collection pen design and sexual stimulation of boars on behavior and sperm output—a review. *Proceedings of the V International Conference on Boar Semen Preservation. Theriogenology.* 63, (2): 630-642.
151. **Liptrap** D.O., Miller E.R., Ullrey D.E., Whitenack D.L., Schoepke B. L., Luecke R.W. 1970: Sex influence on the zinc requirement of developing swine. *J. Anim. Sci.* 30, 736-741.
152. **Ljungvall** K., Spjuth L., Hultén F., Einarsson S., Rodriguez-Martinez H., Andersson K., Magnusson U. 2006. Early post-natal exposure to low dose oral di(2ethylhexyl) phthalate affects the peripheral LH-concentration in plasma, but does not affect mating behavior in the post- pubertal boar. *Reproductive Toxicology* 21, (2): 160–166.
153. **Louis** G.F., Lewis A.J., Weldon W.C., Miller P.S., Kittok R.J., Stroup W.W. 1994a. The effect of protein intake on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations. *J. Anim. Sci.* 72:2038-2050.
154. **Louis** G.F., Lewis A.J., Weldon W.C., Ermer P.M., Miller P.S., Kittok R.J., Stroup W.W. 1994b. The effect of energy and protein intakes on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations. *J. Anim. Sci.* 72:2051-2060.
155. **Lunstra** D.D., Ford J.J., Christenson R.K., Allrich R.D. 1986. Changes in Leydig cell ultrastructure and function during pubertal development in the boar. *Biol Reprod.* 34(1):145-58.
156. **Lunstra** D.D., Wise T.H., Ford J.J. 2003. Sertoli cells in the boar testis: changes during development and compensatory hypertrophy after hemicastration at different ages. *Biology of Reproduction*, 68(1), 140-150.
157. **McDonald** L.E. 1991. *Endocrinología veterinaria y reproducción* /, editor; traducción de Eliane Cazenave Isoard. México: Interamericana.McGraw-Hill, cop. 1991 Edición 4a. ed. 551 p. ISBN 968-25-1641-2.
158. **MacDonald** R.S. 2000. The role of zinc in growth and cell proliferation. *Journal of Nutrition.* 130:1500S-1508S.

159. **Madsen** M.T., Eriksen K. 2001. Fodring af orner. Et litteraturstudium med vægt på ornens reproduktionsmæssige præstation. Rapport nr. 18, Landsudvalget for Svin.
160. **Manteca**, X., Velarde A., Font J. 2002. Comportamiento y bienestar animal en la detección de celos, el manejo del verraco y la gestación. Capítulo I. Revista/Libro Porci: Comportamiento Y Estrés Porcino. Número 67. ed. Madrid - España: Tratado De Ganado Porcino. Monografía de actualidad. Aula Veterinaria. Ediciones Luzan5 S.A. España, p.11-21.
161. **Marchesi** M.G. 2003. Nutrición del verraco. ANAPORC. Pp. 23:63-77.
162. **Maret**, W. 2006. Zinc coordination environments in proteins as redox sensors and signal transducers. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8 (9-10): 1419-1441.
163. **Maret** W., Li Y. 2009. Coordination Dynamics of Zinc in Proteins. *Chemical Reviews*, 2009, 109 (10), pp: 4682–4707.
164. **Maremanda** K.P., Khan S., Jena G. 2014. Zinc protects cyclophosphamide-induced testicular damage in rat: involvement of metallothionein, tesmin and Nrf2. *Biochemical and biophysical research communications*, 445(3), 591-596.
165. **Marin-Guzman** J., Mahan D.C., Pate J. L. 2000. Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. *J. Anim. Sci.* 78(6):1537–1543.
166. **Marin-Guzman** J., Mahan D.C., Chung Y.K., Pate J.L., Pope W.F. 1997. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. *J. Anim. Sci.* 75 (11): 2994–3003.
167. **Martín Rillo**, S. 1996. Avances en el control de la reproducción en ganado porcino. Capítulo 2. Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal. Edit. Garde J.J., Gallego L. Cuenca: Servicio de publicaciones de la Universidad de Castilla-La Mancha. Colección Estudios No. 32. pág. 31-50. ISBN: 84-8949492-31-X
168. **Martin Rillo** S., De Alba C., Cidoncha R., Pérez Marcos C. 2000. La inseminación artificial en el cerdo ibérico. *Mundo Ganadero*. Septiembre. 125: 52-55.
169. **Martin** R.E., Mahan D.C., Hill G.M., Link J.E., Jolliff J.S. 2011. Effect of dietary organic microminerals on starter pig performance, tissue mineral concentrations, and liver and plasma enzyme activities. *J Anim Sci*. 89, (4):1042-1055.
170. **Martínez** Amesti, N. El entrenamiento del verraco púber y su adaptación en la granja de destino. *Hypor*.
171. **Mateos** G.G., Medel P., Carrión D. 1997. Necesidades nutricionales del verraco de alta selección. XIII Curso de Especialización FEDNA. Madrid.

172. **Mateos** G.G., García Valencia D., Jiménez Moreno E. 2004. Microminerals in diets for monogastrics: technical and legal aspects (in Spanish). Cursos de especialización FEDNA. De Blas, C., G. G. Mateos, and P. Garcia (eds.). FEDNA 20: 210-265.
173. **Mavromichalis** I. 2010. Issues with Zinc Oxide. AASV News. 9 Pig Progress.net.
174. **McMahon** R.J., Cousins, R.J. 1998. Mammalian zinc transporters¹, 2. The Journal of nutrition, 128(4), 667-670.
175. **Mendis-Handagama** S.M.L.C., Ariyaratne H.B.S. 2001. Differentiation of the Adult Leydig Cell Population in the Postnatal Testis. Biology of Reproduction 65, (3): 660–671.
176. **Mendoza** Huaitalla R., Gallmanna E., Zhenga K., Liua X., Hartunga E. 2010. Heavy metals contents in farrowing, weaning and fattening pig feeds in a commercial pig farm in Beijing and their thresholds values given by the Chinese feed standards. (International symposium on sustainable animal production in the tropics: farming in a changing world). Advances in Animal Biosciences. 1, (2): 470-471.
177. **Meng** Z., Qin G., Zhang B., Bai J. 2004. DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from various organs of mice. Mutagenesis, 19(6), 465-468.
178. **Miranda-de la Lama** G.C., Mattiello S. 2010. Review. The importance of social behaviour for goat welfare in livestock farming. Small Ruminant Research. 90, (1-3): 1-10.
179. **Molokwu** C.O., Li Y.V. 2006. Zinc homeostasis and bone mineral density. Ohio Res Clin Rev, 15, 7-15.
180. **Moreno** Grande A., Ferreiro J.M., Cantalapiedra J., Feas X., Iglesias A., Araujo J.P., Ramella J.L. 2009. Comportamiento de los mamíferos domésticos. El porcino. Feagas, Nº. 35, págs. 50-57.
181. **Mozaffari** Z., Parivar K., Roodbari N.H., Irani S. 2015. Histopathological Evaluation of the Toxic Effects of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles on Testicular Tissue of NMRI Adult Mice. Advanced Studies in Biology, 7(6), 275-291.
182. **Mullan** B.P., Hernández A., D'Souza D.N., Pluske J.R. 2005. Modern pig nutrition for performance: minerals, metabolism and the environment. In: Proceedings of Alltech's 21st Annual Symposium, ed: Lyons T.P. and Jaques K.A. 185-200. Nottingham, United Kingdom: Nottingham University Press.
183. **NRC**. 1998. National Research Council. Nutrient requirements of swine. 9th Edition, Washington, DC: National Academy Press.
184. **NSNG**. 2010. National Swine Nutrition Guide. Tables on nutrient recommendations, ingredient composition, and use rates. Pork center of excellence. Iowa State University. USA.

185. **NAP**, 2005. Mineral tolerance of animals. Second revised edition. The national academies press.
186. **Nitrayova S.**, Windisch W., von Heimendahl E., Müller A., Bartelt J. 2012. Bioavailability of zinc from different sources in pigs. *Journal of animal science*, 90(Supplement_4), 185-187.
187. **Oberlender G.**, Solis Murgas L.D., de Lima D., Schwarz Gaggini T., Zangeronimo M.G., Neves Alvarenga A.L., Moreira Silva D. 2010. Alterações endócrinas em reprodutores suínos de alto desempenho. *Ci. Anim. Bras.*, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 245-250, jan./mar.
188. **Okamura N.**, Tamba M., Uchiyama Y., Sugita Y., Dacheux F., Syntin P., Dacheux J-L. 1995. Direct evidence for the elevated synthesis and secretion of procathepsin L in the distal caput epididymis of boar. *Biochem Biophys Acta* 1245, (2): 221-226.
189. **Om A.S.**, Chung K.W. 1996. Dietary zinc deficiency alters 5 α -reduction and aromatization of testosterone and androgen and estrogen receptors in rat liver. *Journal of Nutrition*, 126(4), 842-848.
190. **Opletal L.**, Rozkot M., Lustyková A., Frydrychová S., Daněk P., Václavková E. 2008. Natural compounds potentially influencing pig reproduction – Review. *Research in Pig Breeding*. 2, (2): 50-54.
191. **Oskam I.C.**, Ropstad E., Andersen Berg K., Fredriksen B., Larsen S., Dahl E., Andresen Ø. 2008. Testicular germ cell development in relation to 5 α -Androstenone levels in pubertal entire male pigs. *Theriogenology* 69, (8): 967–976.
192. **Oskam I.C.**, Lervik S., Tajet H., Dahl E., Ropstad E., Andresen Ø. 2010. Differences in testosterone, androstenone, and skatole levels in plasma and fat between pubertal purebred Duroc and Landrace boars in response to human chorionic gonadotrophin stimulation. *Theriogenology* 74, (6): 1088–1098.
193. **Oyeyemi M.O.**, Ubiogoro O. 2005. Spermogram and morphological characteristics in testicular and epididymal spermatozoa of large white boar in Nigeria. *Int. J. Morphol.*, 23, (3): 235-239.
194. **Özaslan M.**, Kılıç I.H., Aytekin T., Güldür M.E., Bozkurt A.I. 2005. Investigation of antioxidant effect of zinc biochemically and histopathologically in rats. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 19, (2): 136-143.
195. **Ozturk A.**, Baltaci A.K., Mogulkoc R., Oztekin E., Sivrikaya A., Kurtoglu E., Kul A. 2003. Effects of zinc deficiency and supplementation on malondialdehyde and glutathione levels in blood and tissues of rats performing swimming exercise. *Biological trace element research*, 94(2), 157-166.

196. **Pallauf** J., Müller A.S. Chapter 6. Inorganic feed additives. (2006). *Biology of Nutrition in Growing Animals*. ©Elsevier Limited. All rights reserved. Vol. 4; Pag. (179, 180, 185-193, 220-249).
197. **Parkin**, Gerard. 2000. The bioinorganic chemistry of zinc: synthetic analogues of zinc enzymes that feature tripodal ligands. *Chem. Commun.*, 1971–1985.
198. **Patience** J.F., Chipman A. 2011. Impact of Zinc source and timing of implementation on grow-finish performance, carcass composition and locomotion score. R2655. Iowa State University Animal Industry Report.
199. **Pearl** C.A., Roser J.F. 2008. Expression of lactoferrin in the boar epididymis: effects of reduced estrogen. *Domestic Animal Endocrinology*. 34, (2): 153–159.
200. **Penchev** G. 2011. Postnatal development of interstitial endocrine (Leydig) cells in pig's testes—electron microscopy study. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 14(3), 131-136.
201. **Petherick**, J.C. 2005. A review of some factors affecting the expression of libido in beef cattle, and individual bull and herd fertility. *Applied Animal Behaviour Science*. 90, (3-4): 185-205.
202. **Pfaus** J.G., Kippin T.E., Centeno S. 2001. Conditioning and Sexual Behavior: A Review. *Hormones and Behavior*. 40, (2); 291–321.
203. **Pfaus** J.G., Kippin T.E., Coria-Avila G. 2003. What can animal models tell us about human sexual response?. *Annu. Rev. Sex. Res.* 14:1-63.
204. **Piotrowska** K., Baranowska-Bosiacka I., Marchlewicz M., Gutowska I., Nocerń I., Zawislak M., Chlubek D., Wiszniewska B. 2011. Changes in male reproductive system and mineral metabolism induced by soy isoflavones administered to rats from prenatal life until sexual maturity. *Nutrition* 27, (3): 372–379.
205. **Poto** A., Peinado B., Rosique M., Martínez M., Barba C. 2000. Comportamiento del cerdo chato murciano frente maniquí en la sala de extracción de semen. Estudio preliminar de la libido. *Archivos de zootecnia*. 49, (185-186); 87-93.
206. **Poulsen** H.D., Carlson D. 2001: Bioavailability of zinc from different zinc sources. *Proc. 52nd Ann. Meeting Eur. Ass. Anim. Prod.*, Budapest, Hungary. EAAP publications, p.123 (Abstr).
207. **Price**, E.O., 2002. *Animal Domestication and Behavior*. CABI Publishing, Oxon, UK.
208. **Quiles** Sotillo A., Hevia Méndez M.L. 2002. Cantidad y calidad espermática del verraco. *Ganadería*. 14: 20-24.

209. **Quiles** Sotillo A., Hevia Méndez M.L. 2004. Influencia de la nutrición sobre la productividad del verraco. *Ganadería*. 25: 28-31.
210. **Quiles** Sotillo A., Hevia Méndez M.L. 2009. Estrategias nutricionales para reducir el impacto medioambiental de las explotaciones porcinas. *Producción Animal*. Enero-febrero Nº 250. pp.6-24.
211. **Radostits** O.M., Houston D.M., Mayhew I.G. 2002. Examen y diagnóstico clínico en veterinaria. Ediciones Harcourt Elsevier Science Imprint. Pag, 719- 726. ISBN: 9788481745863.
212. **Regalla** L.M., Lyons T.J. 2006. Zinc in yeast: mechanisms involved in homeostasis. In *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification* (pp. 37-58). Springer Berlin Heidelberg.
213. **Ren** D., Xing Y., Lin M., Wu Y., Li K., Li W., Yang S., Guo T., Ren J., Ma J., Lan L., Huang L. 2009. Evaluations of boar gonad development, spermatogenesis with regard to semen characteristics, libido and serum testosterone levels based on large White Duroc x Chinese Erhualian crossbred boars. *Reprod. Domest. Anim.* 44, (6): 913–919.
214. **Rink** L., Gabriel, P. 2001. Extracellular and immunological actions of zinc. *BioMetals* 14, (3-4): 367–383.
215. **Riopérez** J. 1991. Nutrición de verracos. *ANAPORC*. 104:64-79. España.
216. **Robinson** J.J. 1990. Nutrition in the reproduction of farm animals. *Nutrition Research Reviews*. 3, (1): 253-216.
217. **Roh** H. C. Collier S., Deshmukh K., Guthrie J., Robertson J.D., Kornfeld K. 2013. ttm-1 encodes CDF transporters that excrete zinc from intestinal cells of *C. elegans* and act in a parallel negative feedback circuit that promotes homeostasis.
218. **Romeo** R.D., Cook-Wiens E., Richardson H.N., Sisk C.L. 2001. Dihydrotestosterone activates sexual behavior in adult male hamsters but not in juveniles. *Physiology & Behavior* 73, (4): 579– 584.
219. **Romeo** R.D., Richardson H.N., Sisk C.L. 2002. Puberty and the maturation of the male brain and sexual behavior: recasting a behavioral potential. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 26, (3): 381-391.
220. **Roser** J.F. 2009. Chapter 2. Reproductive Endocrinology of the stallion. In: *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. (Second Edition). Edited by: Samper J.C. pp. 17-31. Copyright © Elsevier Inc. All rights reserved. ISBN: 978-1-4160-5234-0.
221. **Rostagno** H.S. 2000. Tabelas brasileiras para aves e suínos. Universidad Federal de Viçosa. Viçosa, Brazil.

222. **Rothschild** M.F., Ruvinsky A. 2011. The genetics of the pig. 2nd ed. © CAB International. All rights reserved. 520. ISBN 978-1-84593-756-0.
223. **Rupić** V., Luterotti S., Čepelak I., Rekić B., Grbeša D., Knežević M. 2004. Calcium, Phosphorus, Zinc and their ratios in serum of fattening swine fed different diets in respect to Zinc. *Acta Veterinaria (Beograd)*. 54, (2-3): 175-189.
224. **Safranski** T.J. 2008. Genetic selection of boars. *Proceedings of the VIth International Conference on Boar Semen Preservation, Proceedings of the VIth International Conference on Boar Semen Preservation. Theriogenology*. 70, (8): 1310–1316.
225. **Sala** Echave R., Reguera Díaz de Terán G., Pérez-Llano B., García-Casado P. 2007. Influencia de la nutrición y alimentación del verraco sobre la producción espermática. *Revista Albèitar*. Nº 109 Octubre. Pág.54-59. ISSN 1699-7883.
226. **Sandström** B. 2001. Diagnosis of zinc deficiency and excess in individuals and populations. *Food & Nutrition Bulletin*. Volume 22, Number 2, pp. 133-137(5)
227. **Sankako** M.K., Garcia P.C., Piffer R.C., Dallaqua B., Damasceno D.C., Pereira O.C. 2012. Possible mechanism by which zinc protects the testicular function of rats exposed to cigarette smoke. *Pharmacol Rep*. 64(6):1537-46.
228. **Schlegel** P., Nys Y., Jondreville C. 2010. Zinc availability and digestive zinc solubility in piglets and broilers fed diets varying in their phytate contents, phytase activity and supplemented zinc source. *Animal*. 4, (2): 200–209.
229. **Schell** T.C., Kornegay E.T. 1996. Zinc concentration in tissues and performance of weanling pigs fed pharmacological levels of zinc from ZnO, Zn-methionine, Znlysine, or ZnSO₄. *J Anim Sci*. 74:1584-1593.
230. **Schneider** F., Falkenberg H., Kuhn G., Nürnberg K., Rehfeldt Ch., Kanitz W. 1998. Effects of treating young boars with a GnRH depot formulation on endocrine functions, testis size, boar taint, carcass composition and muscular structure. *Animal Reproduction Science*. 50, (1-2): 69–80.
231. **Sellier** P., Le Roy P., Fouilloux M.N., Gruand J., Bonneau M. 2000. Responses to restricted index selection and genetic parameters for fat androstenone level and sexual maturity status of young boars. *Livestock Production Science*. 63, (3): 265-274.
232. **Semrad**, Carol E. 1999. Zinc and Intestinal Function. *Current gastroenterology reports*. 1, (5): 398-403.
233. **Sharpe** R.M., McKinnell C., Kivlin C., Fisher J.S. 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*. 125, (6): 769–784.
234. **Smital** J., Wolf J. 2010. Estimation of genetic parameters for boar semen traits. *Research in Pig Breeding*. 4, (2): 22-25.

235. **Sonderman J.P.**, Luebke J.J. 2008. Semen production and fertility issues related to differences in genetic lines of boars. Proceedings of the VIth International Conference on Boar Semen Preservation. Theriogenology. 70, (8): 1380–1383.
236. **Šprem N.**, Piria M., Florijančić T., Antunović B., Dumić T., Gutzmirtl H., Curik I. 2011. Morphometrical analysis of reproduction traits for the wild boar (*Sus scrofa* L.) in Croatia. Agriculturae Conspectus Scientificus (ACS), 76(3), 263-265.
237. **Šprysl M.**, Čítek J., Stupka R. 2010. Monitoring of the reproduction performance in hybrid pigs by help of field tests. Research in Pig Breeding. 4, (1): 37-40.
238. **Spears J.W.** 1996. Organic trace minerals in ruminant nutrition. Animal Feed Science Technology. 58:151-163.
239. **Suttle N.F.** 2010. Mineral nutrition of livestock. 4th ed. Cabi. ISBN13: 978 1 845934729.
240. **Swinkels J.W.G.M.**, Kornegay E.T., Verstegen M.W.A. 1994. Biology of zinc and biological value of dietary organic zinc complexes and chelates. Nutrition Research Reviews 7, (1): 129-149.
241. **Syntin, P.**, Dacheux F., Druart X., Gatti, J.L., Okamura N., Dacheux J.L., 1996. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. Biol. Reprod. 55, (5): 956-74.
242. **Talebi A.R.**, Khorsandi L., Moridian M. 2013. The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis. Journal of assisted reproduction and genetics, 30(9), 1203-1209.
243. **Terrés Martos, C.** 1999. Tesis doctoral: Determinación de los niveles de Zn en alimentos, suelos y bebidas del área de Motril. Evaluación de su ingesta en la dieta. Universidad de Granada.
244. **Terlouw S.**, Burke P., Simmet C., James E., Shlimgen T., Gunderson G., Day B., Didion B., Dobrinsky J. 2008. Hands off boar semen collection. Midwest boar stud managers conference. St. Louis Missouri. USA. Pp 18-23.
245. **Thomas H.R.**, Kattesh H.G., Knight J.W., Gwazdauskas F.C., Meacham T.N., Kornegay E. T. 1979. Effects of housing and rearing on age at puberty and libido in boars. Animal Production. 28, (02): 231-234.
246. **Tokach M.**, Sulabo R., Goodband R., Dritz S., DeRouchey J. 2009. Boar Nutrition. Swine Profitability Conference. Sponsored by Department of Animal Sciences and Industry K-State Research and Extension Kansas State University, Manhattan. pp. 38-41.
247. **Tonn S.R.**, Davis D.L., Craig J.V. 1985. Mating Behavior, Boar-to-Boar Behavior during Rearing and Soundness of Boars Penned Individually or in Groups from 6 to 27 Weeks of age. J. Anim. Sc. 61, (2):287-296.

248. **Tran** C.D., Cool J., Xian C.J. 2011. Dietary zinc and metallothionein on small intestinal disaccharidases activity in mice. *World J. Gastroenterol.* 17, (3): 354-360.
249. **Tuormaa** Tuula E. 1995. Adverse effects of zinc deficiency: a review from the literature. *Journal of Orthomolecular Medicine.* 10, (3-4): 149-164.
250. **Turgut** S, Kaptanoğlu B, Turgut G, Emmungil G, Genç O. 2005. Effects of cadmium and zinc on plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor-binding protein 3. *Biological Trace Element Research.* 108, (1-3):197–204.
251. **Underwood** E.J., Suttle N.F. 1999. The mineral nutrition of livestock, 3rd Edition. United Kingdom: CABI Publishing.
252. **Van Straaten** H.W.M., Wensing, C.J.G. 1977. Histomorphometric aspects of testicular morphogenesis in the pig. *Biology of reproduction*, 17(4), 467-472.
253. **Vallee**, B.L., Coleman, J.E., Auld, D.S., 1991. Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 88, (3): 999–1003.
254. **Veum** T.L., Ledoux D.R., Shannon M.C. and Raboy V. 2009. Effect of graded levels of Iron, Zinc, and Copper supplementation in diets with low-phytate or normal barley on growth performance, bone characteristics, hematocrit volume, and Zinc and Copper balance of young swine. *J. Anim. Sci.* 87, (8): 2625-2634.
255. **Wedekind** K.J., Lewis A.J., Giesemann M.A., Miller P.S. 1994. Bioavailability of zinc from inorganic and organic sources for pigs fed corn-soybean meal diets. *J. Anim. Sci.* 72:2681-2689.
256. **Wen** Q., Liu Y., Gao F. 2011. Fate determination of fetal Leydig cells. *Front. Biol.* 6, (1): 12–18.
257. **Willenburg** K.L., Miller G.M., Rodriguez-Zas S.L., Knox R.V. 2003. Effect of boar exposure at time of insemination on factors influencing fertility in gilts. *J Anim Sci* 81, (1): 9-15.
258. **Williams** RJ.1984. Zinc: what is its role in biology?. *Endeavour.* 8(2):65-70.
259. **Wise** T., Lunstra D.D., Rohrer G.A., Ford J.J. 2003. Relationships of testicular iron and ferritin concentrations with testicular weight and sperm production in boars. *J Anim Sci.* 81, (2): 503-511.
260. **Woodson**, J.C. 2002. Including “learned sexuality” in the organization of sexual behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 26, (1): 69-80.
261. **Wu** D. 2009. Interaction of hormones, aging and sexual experience on masculine sexual behavior and hormone receptor expression in the hypothalamus. Thesis Doctor of Philosophy. The University of Texas at Austin.

262. **Yamasaki** S., Sakata-Sogawa K., Hasegawa A., Suzuki T., Kabu K., Sato E., Kurosaki T., Yamashita S., Tokunaga M., Nishida K., Hirano T. 2007. Zinc is a novel intracellular second Messenger. *The Journal of Cell Biology*. 177, (4): 637–645.
263. **Yeh** K-Y., Pu H-F., Kaphle K., Lin S-F., Wu L.S., Lin J.H., Tsai Y-F. 2008. *Ginkgo biloba* extract enhances male copulatory behavior and reduces serum prolactin levels in rats. *Hormones and Behavior* 53, (1): 225–231.
264. **Yeh** K-Y., Pu H-F., Wu C-H., Tai M-Y., Tsai Y-F. 2009. Different subregions of the medial preoptic area are separately involved in the regulation of copulation and sexual incentive motivation in male rats: A behavioral and morphological study. *Behavioural Brain Research*. 205, (1): 219-225.
265. **Zamaratskaia** G., Rydhmer L., Chen G., Madej A., Andersson H.K., Lundström K. 2005. Boar taint is related to endocrine and anatomical changes at puberty but not to aggressive behaviour in entire male pigs. *Reproduction in Domestic Animals*. 40, (6): 500–506.
266. **Zamaratskaia** G., Lou Y., Chen G., Andresen Ø., Lundström K., Squires E.J. 2007. Effect of hCG stimulation on plasma androstenone concentrations and cytochrome b5 levels in testicular tissue. *Reproduction in Domestic Animals*. 42, (1): 105–108.
267. **Zamaratskaia** G, Oskam IC, Ropstad E, Tajet H, Dahl E, Andresen O. 2008a. Effects of hCG stimulation on hepatic activities of cytochromes P450E1 and P450A in pubertal male pigs. *Reproduction in Domestic Animals*. 43, (2): 147–152.
268. **Zamaratskaia** G., Rydhmer L., Andersson H.K., Chen G., Lowagie S., Andersson K., Lundström K. 2008b. Long-term effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac™, on hormonal profile and behaviour of male pigs. *Animal Reproduction Science*. 108, (1-2); 37–48.
269. **Zimmerman** D.R., Purkhiser E.D., Parker J.W. 1981. Management of developing gilts and boars for efficient reproduction. *Pork Industry Handbook*. Vol. 74, Cooperative Extension Service, Michigan State University. Extension Bulletin E-1534 p. 4.

RESUMEN

El uso de fuentes de **Zn** (orgánicas e inorgánicas) en el pienso de cerdos prepúberes se ha mostrado indispensable, ya que este mineral ha evidenciado beneficios relacionados con aspectos reproductivos, respuesta inmunitaria, estado de salud, ganancia de peso, consumo de pienso. Los primeros estudios que identificaron al **Zn** como componente fundamental en la reproducción fueron en la década de los 40's, en donde se estableció la importancia de este mineral en el desarrollo de las células de Leydig, a partir de estos descubrimientos se recomienda la utilización del mineral en el pienso de los cerdos. Sin embargo, las recomendaciones que se han hecho para apoyar el efecto del **Zn** en la reproducción, fueron identificadas hace 30 años, y poco se ha estudiado desde entonces con respecto al nivel de **Zn** que habría que incluir en el pienso. Por otra parte, la industria alimenticia animal ha desarrollado fuentes minerales con mayor biodisponibilidad, por un lado para que el organismo pueda utilizarlo más rápida y eficientemente (>biodisponibilidad) y por otra parte para evitar que el mineral consumido por el animal, se pierda a través de las deyecciones, asegurando con ello no solo la reducción de las pérdidas económicas, sino la minimización del impacto ambiental que el **Zn** ejerce negativamente. De esta manera, se decidió realizar una investigación que proporcionara información sobre el efecto de las fuentes y niveles de **Zn**, en la eficiencia de crecimiento y desarrollo de cerdos prepúberes y verracos jóvenes, en el desarrollo de los testículos y sus estructuras celulares, así como en el comportamiento sexual de los verracos jóvenes. Para lo anterior se utilizaron 50 cerdos de la línea genética York x Landrace, con un peso medio inicial de 35 ± 1.25 , estos animales se distribuyeron en siete tratamientos, los cuales correspondieron a dietas formuladas con y sin la adición de fuente de **Zn** (**ZnSO₄**, **ZnO**, **ZnMet**) , y a dos niveles (150ppm y 200ppm de **Zn**). La dieta base fue formulada utilizando la tabla de necesidades nutritivas del **FEDNA (2006)**. Todos los cerdos fueron colocados en jaulas individuales, con comedero y bebedero individual. Se les dio un periodo de adaptación de 15 días, posteriormente se inició la fase experimental en la que se midió el consumo de pienso (**CDP**), conversión alimenticia (**CA**), ganancia de peso (**GDP**), al finalizar el periodo de crianza (Crecimiento, Desarrollo y Finalización) y los cerdos llegaron a un peso mayor a 100Kg, se sacrificaron tres cerdos, de los cuales se obtuvieron los testículos, epidídimos, bazo, páncreas, hueso (fémur), hígado y riñones, para analizar a través de Espectrofotometría de Absorción Atómica la concentración de **Zn**. Además de los testículos se obtuvieron cortes histológicos para analizar el desarrollo de las células de Leydig (**CL**), células de Sertoli (**CS**) y Diámetro tubular seminífero (**DTS**). Asimismo, se obtuvo el índice gonadosomático (**IG**). Posteriormente, 35 verracos

jóvenes fueron sometidos a un proceso de entrenamiento para iniciar la evaluación del comportamiento de los verracos que iniciarían vida reproductiva. Los resultados obtenidos mostraron que los tratamientos no se comportaron de forma distinta en el **CDP** en cerdos prepúberes ($P>0.06$), pero se aumentó el consumo de pienso en verracos jóvenes ($P=0.028$), identificando que el **ZnSO₄200** redujo el **CPD**. La **GDP** mostró diferencias entre tratamientos ($P=0.033$) y por etapa, en Crecimiento el **ZnO150** mejoró la **GDP**. En la etapa de Crecimiento además se mostró mayor variabilidad en las **GDP**, indicando diferencias de hasta 241g obtenidas en media por la fuente **ZnO**, identificando una diferencia ($P<0.0001$) entre fuentes inorgánicas. En tanto que en el periodo Desarrollo y Finalización las ganancias de peso fueron similares entre fuentes y niveles de **Zn**. En el caso de los verracos, se observó una tendencia ($P=0.092$) a mejorar el peso con **ZnO200**. En el caso de la **CA** no se obtuvieron diferencias ($P=0.362$) entre tratamientos, y los valores estuvieron en el orden de 3.29 a 3.85 ($EEM=0.171$), estos valores fueron superiores a los mostrados en Desarrollo (3.17) y Finalización (3.39). EL **PT** fue afectado negativamente por el **ZnSO₄200** ($P=0.006$) en los cerdos prepúberes, pero las fuentes **ZnO** y **ZnMet** se comportaron igual. En el caso de los verracos jóvenes tampoco se observó diferencias en el **PT** ($P>0.05$) el cual estuvo en un intervalo de 302g a 335g ($EEM=0.038$), Por su parte el **IG** de los cerdos prepúberes fue afectado por **ZnSO₄200** ($P=0.002$) ya que el valor de esta característica fue de 0.24. Por su parte los tratamientos que utilizaron **ZnO** y **ZnMet** mostraron valores de **IG** iguales ($P>0.05$). En cuanto a los verracos jóvenes, el **IG** no superó 0.183 y tampoco se mostró diferencias entre tratamientos ($P>0.05$). EL número de **CL** se redujo ($P<0.05$) al utilizar piensos sin suplementación de **Zn** (**Control**) un 28.5% en cerdos prepúberes y un 14.61% en verracos jóvenes. El número de **CL** identificadas en cerdos prepúberes y verracos jóvenes fue de entre 18 y 20 **CL** con el uso de **Zn** adicionado al pienso. El efecto de la fuente y nivel de **Zn** en el número de **CL** no fue identificado ($P>0.05$). La concentración de **[T]** mostro diferencias motivadas por el tratamiento. La concentración de **[T]** en el plasma sanguíneo de cerdos prepúberes fue de 2.52ng mL⁻¹ a 4.05ng mL⁻¹. Los análisis de correlación (r) mostraron que el número de **CL** tiene un grado de relación del 30%, y se observó que el **ZnMet** produjo un efecto positivo en la **[T]**. Por su parte el **DTS** mostró ser igual para todos los tratamientos ($P=0.331$), y en los dos periodos evaluados, siendo para cerdos prepúberes de entre 112µm a 131µm, y para verracos de 127.7µm a 140.20µm. Estas diferencias fueron significativas ($P=0.021$) entre periodos. Por su parte el número de **CS** mostrado por los cerdos prepúberes identifico un efecto de los tratamientos aplicados ($P<0.0001$). El tratamiento **Control** tuvo mayor cantidad de **CS**

que el resto de tratamientos (4.72 vs 1.9) que incluyeron alguna fuente de **Zn**. Por su parte **ZnMet** mostro que con el uso de 150ppm se redujeron las **CS** (150ppm=1.35 vs 200ppm=1.90; **P=0.057**). Siguiendo con el comportamiento de los cerdos prepúberes, también los verracos jóvenes mostraron una reducción en el número de **CS** (**P=0.050**) con el uso de los tratamientos que contenían alguna fuente de **Zn**. La reducción de las **CS** se mantuvo en valores de 1.48 a 2.56, en tanto que el tratamiento **Control** mostró en media 4.12 **CS**. Asimismo, no se observó correlación (**P>0.469**) entre **DTS** y **CS**, pero si fue observada entre el **PT** y el **DTS**. Por su parte la **[T]** tampoco se correlaciono con el **DTS** (**r<0.347**; **P>0.122**) y con el número de **CS** (**r<0.280**; **P>0.218**). La concentración **Zn** obtenida en los órganos analizados se presentó de forma distinta, ya que el bazo, testículos y plasma sanguíneo no mostraron diferencias (**P>0.05**) a causa del tratamiento suministrado. Sin embargo, el páncreas, hígado, riñones y huesos (fémur) evidenciaron diferencias en la concentración de **Zn**, según fuera el tratamiento aplicado. En cuanto al comportamiento de los verracos jóvenes durante el entrenamiento en el maniquí de montas, se puede señalar que no fue distinto (**P=0.156**) ya que el número de entrenamientos a los que fueron sometidos los verracos jóvenes fue el mismo, sin embargo el manejo de cada verraco fue distinto, ya que se tuvo que dejar un intervalo de tiempo para que el macho fuera introducido al área de montas, lo cual provoco que el intervalo en días de entrenamiento fuera distinto (**P=0.05**), y en especial en el **ZnMet150** se observara más amplio debido a la facilidad que se tuvo con los verracos de este tratamiento, por lo que no necesitaron una intensidad de entrenamiento mayor al del resto de los tratamientos.

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica. 1.	Medias de mínimos cuadrados del consumo de pienso por día de verracos jóvenes en etapa de entrenamiento.	120
Gráfica 2.	Peso vivo (PV) por tratamiento durante el periodo evaluado	123

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.

Ilustración 1.	Absorción de Zn por las células intestinales	15
Ilustración 2.	Metalotioneína (MT), función y regulación de genes	17
Ilustración 3.	Dedos de Zinc	20
Ilustración 4.	Diagrama sobre las funciones biológicas de Zn	22
Ilustración 5.	Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas	44
Ilustración 6.	Dimensiones del potro de monta	78
Ilustración 7.	Diagrama de actividades dividido en fases experimentales de la investigación para la evaluación de cerdos prepúberes no castrados	91
Ilustración 8.	Diagrama de actividades fases experimentales de la investigación “A” para la evaluación de cerdos prepúberes no castrados	95

ÍNDICE DE IMÁGENES.

Imagen 1.	Corte histológico de testículo de cerdo: sección de túbulos seminíferos identificando la presencia de células de Sertoli, así como la diferenciación de la zona intersticial donde se puede observar la presencia de Células de Leydig	54
Imagen 2.	Maniquí AUTOMATE® Minitube	86
Imagen 3.	Evaluación de las variables morfométricas testiculares	98
Imagen 4.	Evaluación de tejidos testiculares	99
Imagen 5.	Digestión de cenizas de tejidos para determinación mineral	100
Imagen 6.	Filtrado de muestras digeridas para la determinación de minerales en tejidos	101
Imagen 7.	Lectura de la concentración de minerales con el Espectrofotómetro de Absorción Atómica (EAA)	102
Imagen 8.	Lecturas del Espectrofotómetro de Absorción Atómica (EAA)	103
Imagen 9.	Preparación de muestras de suero sanguíneo y kit para la determinación de Testosterona de los cerdos prepúberes	104
Imagen 10.	Incubación de las muestras con el conjugado enzimático y posterior lavado automatizado de microplacas	105
Imagen 11.	Segunda Incubación de las muestras, aplicación de solución Stop para detener la reacción enzimática y realizar la lectura de la placa	106
Imagen 12.	Lectura de la concentración de Testosterona con el lector de microplacas, obteniendo valores de absorbancia media de cada muestra.	106
Imagen 13.	Disección de los tejidos testiculares y obtención de muestras para histología	107
Imagen 14.	Muestras de tejido testicular antes y después de ser procesadas en bloques de parafina para realizar los cortes histológicos	108
Imagen 15.	Obtención de las laminillas con los cortes histológicos de cada testículo	108
Imagen 16.	Evaluación al microscopio de los cortes histológicos testiculares	109
Imagen 17.	Identificación y conteo de estructuras (células de Sertoli y Leydig) en los cortes histológicos	109

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.	Funciones de los minerales	10
	Necesidades Nutricionales de Zn en Cerdos no Castrados y	
Tabla 2	Verracos	40
Tabla 3.	Elementos del comportamiento sexual que pueden ser valorados	73
	Índice de valoración por puntos de la libido de verracos en	
Tabla 4.	entrenamiento	73
Tabla 5.	Clasificación de la libido por niveles	73
Tabla 6.	Clasificación del comportamiento durante el eyaculado	74
Tabla 7.	Equipos utilizados para la realización de la investigación	92
Tabla 8.	Material fungible empleado en la investigación	93
Tabla 9.	Reactivos utilizados en las diferentes pruebas de laboratorio	94
	Valor nutritivo del pienso para cerdos no castrados en	
Tabla 10.	crecimiento	97
	Tratamientos aplicados a cerdos prepúberes no castrados,	
Tabla 10.	utilizando diferente fuente y nivel de Zn	97
	Condiciones de operación del espectrofotómetro para la	
Tabla 11.	determinación de minerales	103
	Condiciones de operación del espectrofotómetro (lector de	
	microplacas) para la determinación de testosterona por	
Tabla 12.	ELISA	105
Tabla 13.	Nivel nutritivo del pienso para verracos en producción	111
	Variables consideradas para la evaluación del comportamiento	
Tabla 14.	sexual de verracos jóvenes	113
	Consumo de pienso por día en cerdos no castrados durante los	
Tabla 15.	periodos de crecimiento-finalización	117
	Comparaciones ortogonales del consumo de pienso de los	
	tratamientos con diferente fuente y nivel de Zn en verracos	
Tabla 16.	jóvenes, en etapa de entrenamiento	120
	Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar del efecto de la	
	fuentes y nivel de Zn en cerdos prepúberes y su relación con la	
Tabla 17.	ganancia de peso diario	122
	Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de variables	
	relacionadas con el comportamiento productivo de verracos	
	jóvenes alimentados con piensos que contenían diferentes	
Tabla 18.	fuentes y niveles de Zn	123

	Efecto de la fuente y nivel de Zn en la conversión alimenticia de cerdos no castrados en el periodo de producción crecimiento-finalización	125
Tabla 19.	Medias de mínimos cuadrados del efecto de la fuente y nivel de Zn, en el peso testicular, peso vivo e índice gonadosomático de verracos jóvenes	126
Tabla 20.	Correlación entre las características físicas testiculares, índice gonadosomático y peso vivo de verracos tratados con diferentes fuentes y niveles de Zn	127
Tabla 21.	Medias de Mínimos Cuadrados y Comparaciones Ortogonales de Células de Leydig, Peso Testicular, Peso Vivo y Concentración de Testosterona Sanguínea en Cerdos Prepúberes	129
Tabla 22.	Correlaciones entre las variables de células de Leydig, peso testicular, peso vivo y concentración de Testosterona sanguínea en cerdos prepúberes	130
Tabla 23.	Medias de Mínimos Cuadrados y Contrastes Ortogonales de las Variables Célula de Leydig, Peso Testicular, Peso vivo y Concentración de Testosterona, en Verracos Jóvenes	132
Tabla 24.	Correlación entre las variables histológicas testiculares (CLD, CLI, CLM), peso testicular (D, I, M), peso vivo y concentración de Testosterona sanguínea en verracos jóvenes	133
Tabla 25.	Medidas de mínimos cuadrados \pm error estándar de la media, comparaciones ortogonales de las variables: Diámetro Tubular Seminífero, células de Sertoli en cerdos prepúberes	134
Tabla 26.	Medidas de Mínimos Cuadrados y Comparaciones Ortogonales de las Variables: Diámetro Testicular y Células de Sertoli en Verracos Jóvenes	136
Tabla 27.	Correlación entre Diámetro Tubular Testicular, Células de Sertoli, Peso Testicular, Peso Vivo y Concentración de Testosterona en Cerdos Prepúberes	137
Tabla 28.	Tabla 30. Correlaciones entre Diámetro Tubular Testicular, Células de Sertoli, Peso Testicular, Peso Vivo y Concentración de Testosterona en Verracos Jóvenes	138
Tabla 29.	Medidas de mínimos cuadrados \pm error estándar de la concentración mineral de bazo de cerdos prepúberes	140
Tabla 30.	Correlaciones (r) entre minerales contenidos en el Bazo de cerdos prepúberes	141
Tabla 31.		

	Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de la	
Tabla 32.	concentración mineral en Páncreas de cerdos prepúberes	141
Tabla 33.	Correlaciones entre minerales de Páncreas en cerdos prepúberes	142
	Medias de mínimos cuadrados \pm error estandar de la	
Tabla 34.	concentración mineral de Hígado de cerdos prepúberes	143
Tabla 35.	Funciones de los minerales	143
	Necesidades Nutricionales de Zn en Cerdos no Castrados y	
Tabla 36.	Verracos	144
Tabla 37.	Elementos del comportamiento sexual que pueden ser valorados	145
	Índice de valoración por puntos de la líbido de verracos en	
Tabla 38.	entrenamiento	146
Tabla 39.	Clasificación de la líbido por niveles	147
Tabla 40.	Clasificación del comportamiento durante el eyaculado	147
Tabla 41.	Equipos utilizados para la realización de la investigación	148
Tabla 42.	Material fungible empleado en la investigación	149
Tabla 43.	Reactivos utilizados en las diferentes pruebas de laboratorio	150
	Valor nutritivo del pienso para cerdos no castrados en	
Tabla 44.	crecimiento	151
	Tratamientos aplicados a cerdos prepúberes no castrados,	
Tabla 45.	utilizando diferente fuente y nivel de Zn	152
	Condiciones de operación del espectrofotómetro para la	
Tabla 46.	determinación de minerales	152
	Condiciones de operación del espectrofotómetro (lector de	
	microplacas) para la determinación de testosterona por	
Tabla 47.	ELISA	153
Tabla 48.	Nivel nutritivo del pienso para verracos en producción	155
	Variables consideradas para la evaluación del comportamiento	
Tabla 49.	sexual de verracos jóvenes	156
	Consumo de pienso por día en cerdos no castrados durante los	
Tabla 50.	periodos de crecimiento-finalización	156